Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Acción de la homocisteína sobre el sistema hemostático

Quintana, Irene Luisa

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Quintana, Irene Luisa. (2003). Acción de la homocisteína sobre el sistema hemostático. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3568_Quintana.pdf

Cita tipo Chicago:
Quintana, Irene Luisa. "Acción de la homocisteína sobre el sistema hemostático". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3568_Quintana.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACCIÓN DE LA HOMOCISTEÍNA SOBRE EL SISTEMA HEMOSTÁTICO

Autora:
Lic. Irene L. Quintana

Directora:
Dra. Lucía C. Kordich

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Área Análisis Biológicos - Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

- 2003 -

PRÓLOGO

En los años recientes el término homocisteína ha cobrado gran importancia. Este hecho se debe a que ha sido ampliamente difundido que los niveles elevados de homocisteína, hiperhomocisteinemia, estarían asociados a una mayor incidencia del desarrollo de la aterosclerosis y la trombosis. Por este motivo hoy ya se incluye a la hiperhomocisteinemia en la lista de los factores de riesgo para las enfermedades vasculares oclusivas, tales como el tabaquismo, dislipidemias, hipertensión, sedentarismo, diabetes, estrés, etc.

En líneas generales se postula que una concentración elevada de homocisteína afectaría la calidad del endotelio normal, con la consecuente activación plaquetaria y del sistema de coagulación y paralelamente, la inhibición del sistema fibrinolítico. Estos eventos alterarían el balance procoagulación – anticoagulación, aumentando así el riesgo de trombosis.

De esta posible relación entre la homocisteína y la hemostasia es que surgió mi interés por este tema, ya que mi experiencia en el terreno científico siempre tuvo relación con el estudio de los mecanismos que mantienen la fluidez de la sangre y la integridad vascular.

Junto a mi directora del grupo de investigación, la Dra. Lucía Kordich, nos planteamos varios interrogantes: ¿Cómo podríamos medir homocisteína en nuestro laboratorio? ¿Cuáles serían los valores de una población sana y los de individuos con episodios trombóticos? ¿Qué factores influirían en los niveles plasmáticos del aminoácido? ¿Cómo y por qué la hiperhomocisteinemia se asocia a la trombosis?

Tratar de responder estas preguntas y muchas otras nos enfrentó al gran desafío de desarrollar una tesis. Hoy ya está escrita. Fue una tarea ardua, pero siempre me acompañó el entusiasmo y las ganas por más. Por supuesto, quedaron muchos aspectos por resolver, pero entiendo que una tesis no es la culminación de un tema sino el comienzo de lo que vendrá.

Irene Quintana

AGRADECIMIENTOS

Muchos son los que me han apoyado a realizar esta tesis. Colaboraron con conocimientos, consejos, estímulo, corrección, afecto. ¿Cómo jerarquizar mi agradecimiento? Imposible. Todos, absolutamente todos fueron muy importantes.

Quiero simbolizar este sentimiento de gratitud en dos personas muy especiales para mí: Lucía y Alejandro.

Agradezco la colaboración de las siguientes instituciones:

Hospital Italiano de Buenos Aires. Unidad de Hipertensión Arterial

Sociedad Argentina de Medicina Vascular

Hospital Nacional A. Posadas. Servicio de Hematología

Laboratorio Diagnolab

Consultorios de Estudios Hematológicos

RESUMEN

Numerosos estudios epidemiológicos han postulado que concentraciones plasmáticas elevadas de homocisteína (Hcy) constituyen un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular oclusiva, a nivel arterial y venoso. Aún no están esclarecidos los mecanismos fisiopatológicos involucrados en esta asociación. Los objetivos principales de esta tesis fueron:

- Evaluar los niveles plasmáticos de Hcy en diversos grupos poblacionales, con un método analítico accesible y confiable.
- Analizar determinantes genéticos y adquiridos de la homocisteinemia.
- Determinar los valores de corte para homocisteinemia.
- Estudiar la asociación de la variante termolábil de la MTHFR con la trombosis.
- Evaluar la relación entre hiperhomocisteinemia y componentes del sistema hemostático.
- Postular mecanismos responsables de la acción trombogénica de la Hcy.

Para la determinación de la homocisteinemia en los estudios epidemiológicos realizados, se utilizó una técnica de ELISA, cuya validación arrojó resultados precisos y equivalentes a los del método de referencia (HPLC). Las muestras más apropiadas para ser analizadas fueron los plasmas en EDTA o los sueros obtenidos con gel separador, comprobándose que los congelamientos y descongelamientos sucesivos no afectan los resultados. Los valores de homocisteinemia de la población de Buenos Aires resultaron comprendidos entre 5,0-19,2 μM (3 a 59 años de edad); 1,2-11,6 μM (neonatos) y 6,0-30 μM (>65 años). Estos resultados no deben considerarse como valores de referencia; por el contrario, en el análisis de valores de corte se determinó que el nivel plasmático óptimo de Hcy debe ser ≤ 12 μM.

Se observó una prevalencia elevada de hiperhomocisteinemia (HHcy), sugiriendo que aproximadamente el 50 % de nuestra población estaría expuesta a un mayor riesgo de enfermedad vascular. Los niveles de Hcy se incrementaron con la edad de los individuos y resultaron mayores en los hombres que en las mujeres. Se demostró que existe una estrecha relación entre la homocisteinemia y los niveles de ácido fólico, vitamina B_{12} y creatinina. En particular, se observó que la restricción dietaria de folatos aumenta significativamente los niveles de Hcy, mientras que una dieta que aporte 400 μg/día de ácido fólico disminuye notablemente la homocisteinemia.

Entre los factores genéticos que podrían afectar la concentración de Hcy se estudió el polimorfismo C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Se observó que sólo la condición de homocigosis de la mutación se asociaría a niveles aumentados de Hcy.

La HHcy resultó factor de riesgo independiente para la trombosis venosa, mientras que la presencia T677T/MTHFR no se asociaría a esta patología.

En individuos hiperhomocisteinémicos mayores de 65 años se detectaron niveles significativamente aumentados de factor von Willebrand y de dermatán sulfato, probablemente asociados a una disfunción endotelial.

Componentes del sistema hemostático tales como las plaquetas, los factores del sistema de coagulación y la fibrinolisis no mostraron alteraciones en presencia de altas concentraciones de Hcy, cuando fueron evaluados mediante pruebas del laboratorio de hemostasia. Sin embargo, en las experiencias de fibrinoformación se evidenciaron efectos importantes de la Hcy sobre la estructura de la red de fibrina. Se obtuvieron redes compactas, gruesas y muy ramificadas, que generarían coágulos más resistentes a la fibrinolisis. En estos resultados estaría involucrado el

grupo tiol de la Hcy y uno de los componentes afectados en la fibrinoformación sería el factor XIII.
Los hallazgos enunciados constituyen un nuevo aporte para el esclarecimiento de los mecanismos implicados en el efecto trombogénico de la hiperhomocisteinemia.

Palabras claves: Homocisteína, sistema hemostático, valores de corte, MTHFR, redes de fibrina, trombosis.

SUMMARY

Several clinical and epidemiological studies have postulated that a high plasma homocysteine (Hcy) concentration is an independent risk factor for occlusive vascular diseases. The precise physiologic mechanisms of Hcy-associated atherothrombosis remain unclear. Main objectives in the present thesis were:

- To evaluate plasma Hcy levels with a reliable method in various populations.
- To analyze genetic and acquired determinants of homocysteinemia.
- To propose homocysteinemia cut-off values.
- To study the relation between the thermolabile MTHFR variant and thrombosis.
- To evaluate hyperhomocysteinemia-haemostatic system interactions.
- To postulate mechanisms involved in the thrombogenic effects associated to Hcy.

Validation of an ELISA for the determination of plasma Hcy levels was performed. The method provided reliable data and showed agreement with HPLC. The most adequate samples were EDTA plasmas and serum obtained with gels. Frosting and defrosting procedures did not affect samples' stability.

The population of Buenos Aires showed a range of homocysteinemia between 5.0-19.2 μM (ages 3-59 years); 1.2-11.6 μM (newborns) and 6.0-30.0 μM (> 65 years old). These results must not be considered as reference values. On the contrary, homocysteinemia cut-off was 12 μM. Plasma Hcy concentration increased with age and was higher for male than for female. Homocysteinemia correlated inversely with folic acid and vitamin B_{12} levels and positively with serum creatinine levels. Individuals with dietary restriction of folates showed hyperhomocysteinemia; meanwhile a diet providing 400 μg folic acid/day significantly diminished Hcy concentration.

Polymorphism C677T of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) study showed an association of the homozygous mutant genotype with increased plasma Hcy.

Hyperhomocysteinemia resulted in an independent risk factor for venous thrombosis, but MTHFR 677TT would not show an enhancement of the thrombotic events.

In elderly hyperhomocysteinemic subjects high factor von Willebrand and dermatan sulphate levels were measured. Probably, these results would be associated to an endothelial dysfunction in this population.

Platelets, coagulation factors and fibrinolysis did not seem to be affected by high Hcy concentrations in laboratory tests. However, fibrinformation *in vitro* studies showed a significant Hcy-associated effect. Fibrin networks were different from control, with shorter, thicker and more branched fibers, resulting in a more compact structure. These changes would make clots more resistant to fibrinolysis. The thiol group would be involved in this effect and probably, factor XIII could be altered.

These findings represent a new contribution to the knowledge about mechanisms involved in the thrombogenic effects associated with hyperhomocysteinemia.

Key words: Homocysteine, haemostatic system, cut-off values, MTHFR, fibrin networks, thrombosis.

ÍNDICE

Página

Introducción

Metabolismo de la homocisteína 19

Coenzimas del metabolismo de la homocisteína 25

Homocisteinemia 32

Factores genéticos 32

Factores adquiridos 34

Edad-Sexo 38

Determinación de homocisteína 40

Evidencias clínicas asociadas con hiperhomocisteinemia 46

Mecanismos fisiopatológicos asociados a la hiperhomocisteinemia 52

Mecanismos aterogénicos 52

Mecanismos trombogénicos 54

Objetivos 59

Materiales y métodos

Muestras 63

Drogas y reactivos químicos 64

Población 65

Determinación de homocisteinemia 65

Determinaciones de otros analitos fisiológicos 68

Pruebas de evaluación del sistema hemostático 70

Formación de redes de fibrina 76

Perfiles electroforéticos 78

Estudio del polimorfismo C677T de la MTHFR 79

Métodos estadísticos 83

Resultados

Niveles plasmáticos de homocisteína

Validación del método de ELISA 89

Condiciones de las muestras 94

Factores determinantes de la homocisteinemia

Homocisteinemia de la población de Buenos Aires 103

Homocisteinemia y relación con otros analitos fisiológicos en individuos mayores de 65 años 109

Efecto de la restricción de ácido fólico sobre los niveles de homocisteína plasmática 117

Efecto de la suplementación vitamínica sobre los niveles de homocisteína plasmática 125

Relación entre la homocisteinemia y el polimorfismo C677T de la MTHFR 131

Homocisteinemia y trombosis venosa

Determinación de los valores de corte para homocisteinemia 137

Relación entre el polimorfismo C677T de la MTHFR y el riesgo de trombosis venosa 145

Homocisteína y hemostasia

Acción de la homocisteína sobre componentes del sistema hemostático 151

Relación de la homocisteinemia con los niveles de dermatán sulfato y factor von Willebrand 162

Acción de la homocisteína en la formación de la red de fibrina 165

Conclusiones 185

Apéndice

Fórmulas químicas 191

Abreviaturas 195

Referencias bibliográficas 199

Difusión de resultados 217

INTRODUCCIÓN

METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA

En los últimos años ha cobrado interés el conocimiento acerca de la homocisteína (Hcy). Numerosos estudios epidemiológicos postulan que niveles plasmáticos elevados de Hcy constituyen un importante factor de riesgo independiente para la enfermedad aterotrombótica, afectando al sistema vascular coronario, cerebral y periférico[1,2,3], como también al venoso[4].

La Hcy es un aminoácido de 4 átomos de carbono que contiene un grupo sulfhidrilo o tiol en su molécula. Este aminoácido aparece como producto intermedio en el metabolismo de la metionina, fuente principal de radicales metilos en los mamíferos.

La metionina es un aminoácido esencial que procede del catabolismo de proteínas dietarias y endógenas. Para activar al grupo metilo, la metionina es convertida a S-adenosilmetionina (SAM) mediante la incorporación de adenosina trifosfato (ATP), reacción catalizada por la metionin-adenosil transferasa (MAT)[5].

La SAM es la molécula más importante del organismo que actúa como donante directa de grupos metilos. En la acción de transferencia de estos grupos, la SAM se transforma en S-adenosilhomocisteína (SAH) y el metilo cedido, altamente reactivo, puede ser aceptado por una gran variedad de sustratos tales como ácidos nucleicos (ADN, ARN), proteínas, fosfolípidos, mielina, polisacáridos, catecolaminas, etc[6]. Estas reacciones de transmetilación son catalizadas por metiltransferasas y debido a que la SAH es un inhibidor competitivo de estos procesos, la actividad enzimática depende de la relación SAM/SAH. Por lo tanto, para mantener la generación de estos productos metilados esenciales, es necesario que los niveles intracelulares de SAH sean mínimos. Esto se logra por la acción de la SAH-hidrolasa que convierte reversiblemente la SAH en homocisteína y adenosina. Si bien, termodinámicamente este equilibrio está favorecido hacia la biosíntesis de SAH, en condiciones normales la Hcy y la adenosina son removidas rápidamente para evitar la acumulación de SAH.

A su vez la Hcy puede metabolizarse por la vía irreversible de la *transulfuración* o por dos vías alternativas de *remetilación* (Lámina I).

El camino catabólico o de la *transulfuración* de la Hcy tiene lugar sólo en determinados tejidos, fundamentalmente hígado y riñón. Mediante esta vía la Hcy se condensa con serina para formar cistationina. Esta reacción es catalizada por la cistationin-β-sintetasa, la que a su vez requiere vitamina B_6 como coenzima. Posteriormente la cistationina es hidrolizada a cisteína y α-cetobutirato por acción de la γ-cistationasa, y también utiliza vitamina B_6 como cofactor[7].

Por su parte la cisteína puede convertirse en taurina, utilizarse en la síntesis de glutation o bien metabolizarse a sulfato y excretarse por orina.

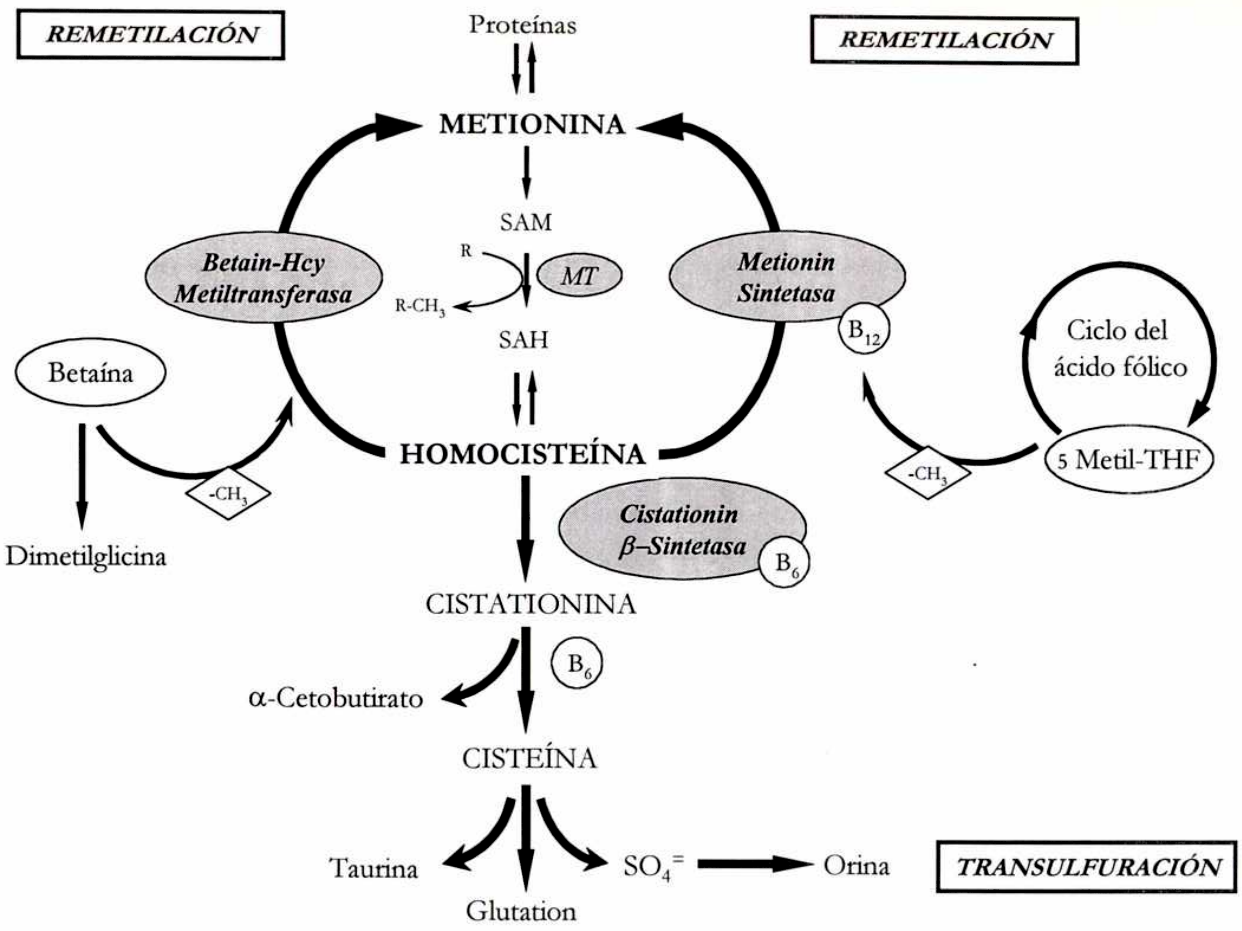
Mediante la *remetilación*, la Hcy se convierte a metionina por ganancia de un grupo metilo. Este proceso puede ocurrir a través de dos rutas alternativas:
(a) la que utiliza 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) como donante del metilo, metionin sintetasa (MS) y vitamina B_{12} como coenzima; o *(b)* la que ocurre cuando el metilo es cedido por la betaína (producto de la oxidación de la colina), por acción de la betain-homocistein metiltransferasa (BHMT).

Que ocurra una u otra vía de *remetilación* dependerá de la disponibilidad enzimática. La MS se distribuye en todas las células mientras que la BHMT se encuentra principalmente en el hígado. Por lo tanto, la conversión de Hcy a metionina catalizada por la MS constituye la vía de *remetilación* predominante y además, representa la intersección del metabolismo de la Hcy con el de la vitamina B_{12} y el ciclo de los folatos (ver pág. 30).

La distribución tisular de todas las enzimas involucradas, la afinidad de éstas por sus sustratos y la concentración de los mismos, regulan las distintas vías metabólicas.

En condiciones normales, aproximadamente la mitad de la Hcy es transformada a metionina por el camino de la remetilación[8]. Cuando se altera la actividad enzimática, ya sea por niveles disminuidos, alteraciones genéticas o menor disponibilidad de sus sustratos, se produce un desbalance metabólico.

Un compuesto clave en esta regulación es la SAM, que ejerce una acción activadora sobre la cistationin-β-sintetasa e inhibitoria sobre la BHMT y la



Metabolismo de la Homocisteína.
SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; THF: tetrahidrofolato; MT: metil transferasa.

Lámina I

metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), enzima del ciclo del ácido fólico[9]. Por lo tanto, la SAM ejerce un efecto modulador sobre las vías metabólicas: Cuando los niveles de metionina son elevados, y por ende los de SAM, se favorece el catabolismo de la Hcy por el camino de la transulfuración; mientras que las concentraciones bajas de SAM inducen la resíntesis endógena de metionina.

Cuando la concentración intracelular de Hcy alcanza niveles potencialmente tóxicos, el aminoácido es exportado fuera de la célula y pasa a circulación. Finalmente las células hepáticas y renales serían las principales responsables de captar la mayor proporción de Hcy circulante para llevar a cabo su catabolismo y/o remetilación.

Se postula que la salida de Hcy desde la célula de origen y la entrada hacia las células de los sitios catabólicos, es mediada por *carriers* específicos: la Hcy intracelular, que principalmente se encuentra en forma reducida, sería transportada fuera de la célula por el denominado *carrier de Hcy reducida* [10]. Ya en sangre, el alto contenido de oxígeno y la presencia de moléculas con grupos tioles inducen la oxidación del aminoácido generando distintos compuestos disulfuros. Además la Hcy puede intervenir en reacciones de intercambio con otros compuestos azufrados a través de puentes disulfuros[§].

Oxidación:

$$\text{Hcy*-SH} + \text{R-SH} + 1/2\ O_2 \longrightarrow \text{Hcy*-S-S-R} + H_2O$$

Reacción de intercambio:

$$\text{Hcy*-SH} + R_1\text{-S-S-}R_2 \longrightarrow \text{Hcy*-S-S-}R_1 + R_2\text{-SH}$$

Hcy*-SH: Homocisteína reducida.

R-SH: Compuesto plasmático con grupo tiol (proteínas, cisteína, glutation, γ-glutamilcisteína, cistinilglicina).

En particular, cuando R-SH es otra molécula de Hcy se obtiene el homodímero denominado homocistina.

[§] Hcy: $HS - \underbrace{CH_2 - CH_2 - CH(NH_2) - COOH}_{\text{Hcy*}}$

Por lo tanto, en circulación sólo el 1 %, aproximadamente, de la Hcy total está presente como Hcy reducida. La mayor proporción, alrededor del 80%, está unida a proteínas (principalmente a la albúmina) y el resto se encuentra formando los dímeros disulfuros o el éster cíclico tiolactona.

Para que la Hcy circulante pueda ser metabolizada, la célula captaría a los distintos disulfuros de Hcy a través de receptores específicos o *carriers de Hcy oxidada.* En el interior de la célula ocurre la reducción y posterior metabolismo. Se postula que el hígado captaría una fracción importante de Hcy unida a proteínas, debido a que este órgano contiene niveles relativamente altos de todas las enzimas necesarias para el catabolismo del aminoácido. En cambio, la mayoría de los disulfuros de Hcy de bajo peso molecular (Hcy-Hcy, Hcy-cisteína, etc.) serían metabolizados por el riñón, ya que durante el filtrado de la sangre estos compuestos (pero no la Hcy unida a proteína) podrían atravesar las células renales[11] (Figura 1).

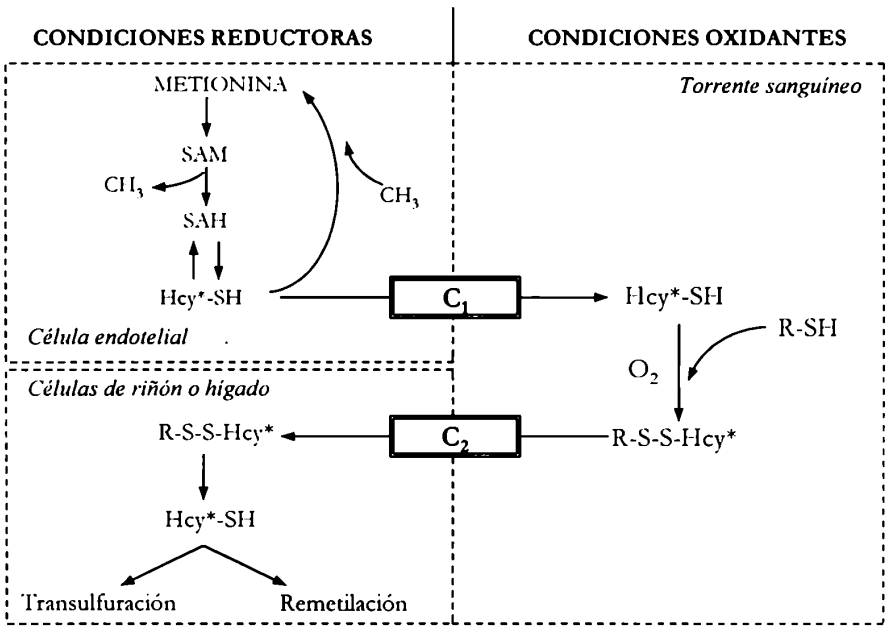


Figura 1. Localización de los procesos de óxido-reducción de la Hcy.
C_1: *carrier* de Hcy reducida; C_2: *carrier* de Hcy oxidada.

COENZIMAS DEL METABOLISMO DE LA HOMOCISTEÍNA

El control del metabolismo de la Hcy también es ejercido por los niveles de ácido fólico y de las vitaminas B_{12}, B_6 y B_2, que actúan como cofactores o coenzimas en diversos pasos metabólicos.

El ácido fólico, en sus diversas formas, y la vitamina B_{12} son sustancias indispensables para la proliferación celular normal.

Estas vitaminas tienen funciones interdependientes en la síntesis de los ácidos nucleicos y están íntimamente relacionadas con el metabolismo de la Hcy (en la vía de remetilación)[12].

ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico o pteroilglutámico es una vitamina cuya molécula está constituida por tres estructuras características: (1) una pterina sustituida, (2) ácido p-aminobenzoico y (3) ácido glutámico.

En la naturaleza existen poliglutamatos, derivados del ácido fólico, que difieren de éste en el número de unidades glutamato.

Las fuentes naturales de folatos son principalmente los vegetales verdes frescos, hígado, levadura y algunas frutas.

Las uniones γ peptídicas presentes en los poliglutamatos son degradadas por hidrolasas específicas, presentes en el tubo digestivo de los mamíferos. De esta manera sólo se absorbe monoglutamato, el cual se reduce rápidamente para formar ácido tetrahidrofólico (THF). Este compuesto actúa como aceptor de diversas unidades de un átomo de carbono, las que se fijan en la posiciones 5 ó 10 del anillo pteridina[13].

Según el radical (R) involucrado en estas reacciones, se sintetizan diversas moléculas con actividad biológica: 5-metiltetrahidrofolato (R = – CH3); 10-formil-

tetrahidrofolato (R= – CH0); 5,10-metilentetrahidrofolato (R= – CH2); ácido folínico (R= – CHO), etc.

En circulación sanguínea el ácido fólico se encuentra como 5-metilTHF y de esta forma es captado por la célula. Los distintos derivados del ácido fólico tienen una función específica en el metabolismo intracelular:

1. *Conversión de homocisteína en metionina:* Esta reacción requiere 5-metilTHF como donante del grupo metilo y utiliza vitamina B_{12} como cofactor. El 5-metilTHF proviene del plasma o se produce intracelularmente por la reducción del 5,10-metilenTHF, reacción catalizada por la enzima metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR).

2. *Conversión de serina en glicina:* El THF es el aceptor de un grupo metileno de la serina y utiliza fosfato de piridoxal (vitamina B_6) como cofactor. Esta reacción da como resultado la formación de 5,10-metilen THF.

3. *Síntesis de timidilato*: El 5,10-metilenTHF dona un grupo metileno al desoxiuridilato para la síntesis de timidilato (paso limitante en la síntesis de ADN), produciéndose además dihidrofolato (DHF).

4. *Síntesis de purinas*: Intervienen dos derivados del ácido fólico, el 10-formilTHF y el 5,10-metenilTHF.

5. *Catabolismo de histidina*: El THF actúa como aceptor del grupo formimino, en la conversión de histidina en ácido glutámico.

6. *Utilización o generación de formiato*: Esta reacción reversible utiliza THF y 10-formilTHF.

Dentro de la célula, el folato es almacenado como poliglutamatos, conjugados a partir de THF y glutamatos por acción de la poliglutamato sintetasa[14] (Figura 2).

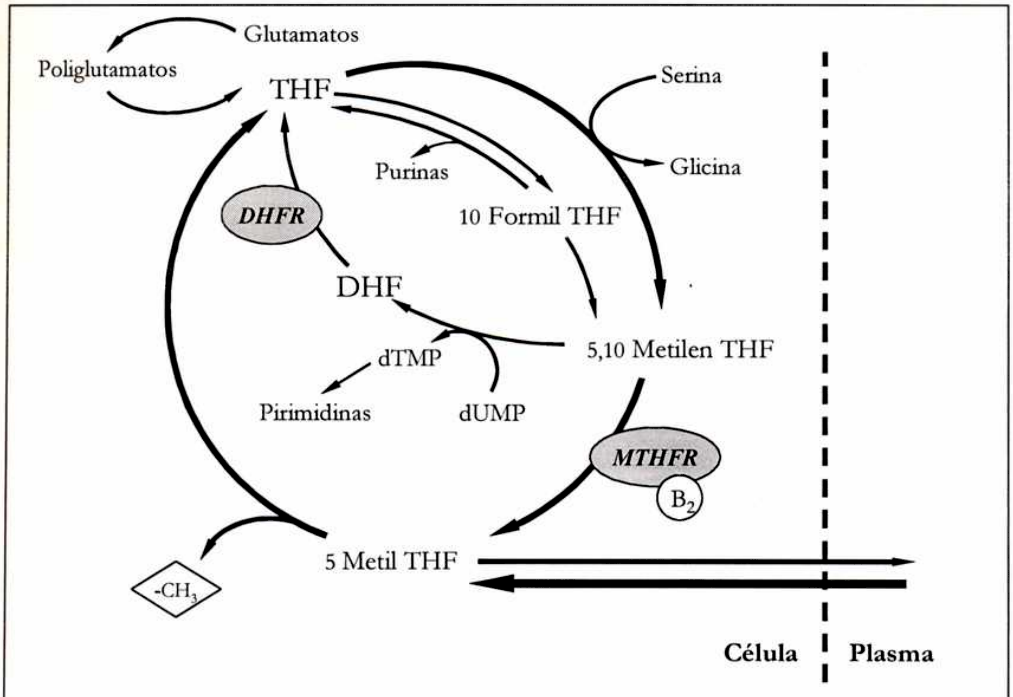


Figura 2. Ciclo del ácido fólico.
THF: tetrahidrofolato; DHF: dihidrofolato; dUMP: desoxiuridilato; dTMP: timidilato.
MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa; DHFR: dihidrofolato reductasa.

VITAMINA B_{12}

El término vitamina B_{12} o cobalamina se refiere a una familia de sustancias que comparten una estructura común: un anillo tetrapirrólico (corrina) unido a un átomo central de cobalto, enlazado a un nucleótido 5,6-dimetilbencimidazol. Al átomo de cobalto se une, además, un grupo R variable que da lugar a los diferentes compuestos:

cianocobalamina (R = –CN), hidroxicobalamina (R = –OH), metilcobalamina (R = –CH3) y 5-desoxiadenosilcobalamina (R = –5desoxiadenosil).

En la naturaleza, las fuentes primarias de vitamina B_{12} son ciertas bacterias que crecen en el suelo, agua o luz intestinal de animales y que sintetizan la vitamina. La cobalamina está presente en carnes, pescado y productos lácteos, pero no se encuentra en los productos vegetales, a menos que estén contaminados con aquellos micro-organismos.

En el proceso digestivo, la vitamina B_{12} de la dieta se libera de las proteínas de origen animal y se une selectivamente a una glucoproteína gástrica, denominada *factor intrínseco* (FI). El complejo vitamina B_{12}–FI interactúa con un receptor específico de las células epiteliales del íleon, donde se absorbe la vitamina B_{12}.

Una vez absorbida, la cobalamina pasa a la circulación sanguínea transportada inicialmente por la proteína *transcobalamina II.* De esta manera el nuevo complejo es captado rápidamente por el hígado (órgano de almacenamiento), células hematopoyéticas y otras células en división. En el plasma existen otras dos *transcobalaminas (I y III)*, cuyas concentraciones se relacionan con la tasa de recambio de granulocitos[15].

Dentro de las células, la vitamina B_{12} es convertida en dos especies biólogicas activas: *metilcobalamina* (en el citoplasma) y *adenosilcobalamina* (en mitocondrias). Estas sustancias son esenciales para el crecimiento y replicación celular ya que intervienen como coenzimas en los siguientes pasos metabólicos:

1. *Conversión de homocisteína en metionina:* En este proceso, catalizado por la metionin sintetasa, la metilcobalamina transfiere el grupo metilo a la Hcy para formar metionina.

$$\text{Homocisteína} \xrightarrow[\textit{Metilcobalamina}]{\text{Metionin sintetasa}} \text{Metionina}$$

2. *Isomerización de L- metilmalonil-Co A a succinil-Co A:* El metilmalonil–Co A se forma a partir de diversos compuestos, entre ellos aminoácidos y ácidos grasos de cadena impar. Por isomerización se convierte en un intermediario del ciclo del ácido cítrico.

$$\text{Metilmalonil-Co A} \xrightarrow[\textit{Adenosilcobalamina}]{\text{Metilmalonil Co A-mutasa}} \text{Succinil-Co A}$$

VITAMINAS B_6 y B_2

La vitamina B_6 comprende a tres compuestos naturáles relacionados, que difieren en el grupo R unido al carbono 4 del núcleo piridina, pero que poseen las mismas propiedades biológicas: piridoxina (R = aldohol primario), piridoxal (R = aldehído) y piridoxamina (R = aminometil). La vitamina B_6 se encuentra en carnes, hígado y numerosos vegetales. Es sensible a la luz ultra violeta, a la oxidación y a altas temperaturas.

En los mamíferos la forma activa de la vitamina es el fosfato de piridoxal, que actúa como coenzima en varias transformaciones metabólicas de aminoácidos, entre ellas la descarboxilación, transaminación y racemización.

En particular, en dos reacciones secuenciales en las que la Hcy es convertida a cisteína, transportando grupos aminos. Un déficit de vitamina B_6 inhibe el catabolismo de la Hcy[16].

Estudios recientes han demostrado que la vitamina B_2 o riboflavina actúa como cofactor de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)[17].

En el organismo la riboflavina tiene actividad biológica bajo las formas de FMN (flavina mononucleótido) y FAD (flavina adenina dinucleótido). En general, la flavina interviene en numerosas reacciones de óxido-reducción. Esta vitamina abunda en la leche, huevo y vegetales verdes.

Se ha demostrado que niveles apropiados de FAD y folatos, pueden contrarrestar la disminución de actividad de la MTHFR, en los casos de alteraciones genéticas de la enzima[18].

RELACIÓN ENTRE HOMOCISTEÍNA - ÁCIDO FÓLICO - VITAMINA B_{12}

Los metabolismos de estos tres compuestos están íntimamente relacionados a través de la metionin-sintetasa, enzima que cataliza la conversión de homocisteína en metionina. Este paso de remetilación necesita grupos metilos, que son aportados por el 5-metil THF, a través de la cobalamina:

La interacción entre folato y cobalamina es esencial para la síntesis normal de purinas y pirimidimas y, por lo tanto, de ADN.

La reacción catalizada por la metionin sintetasa controla el reciclaje de los folatos, la conservación de la concentración intracelular de los poliglutamatos de depósito, el nivel de metionina y de 5-adenosilmetionina (metabolitos esenciales para la metilación de lípidos, proteínas, ADN, etc).

Como consecuencia de esta interrelación, las deficiencias de folato y/o de vitamina B_{12} afectan las reacciones mencionadas. Además, el déficit de vitamina B_{12} limita la disponibilidad de folato ya que éste queda "atrapado" como metiltetrahidrofolato ("hipótesis de la trampa de folato")[19].

Por lo tanto, la falta de suficiente cobalamina para aceptar grupos metilos y transferirlos, inhibe los pasos subsecuentes del metabolismo del folato, causando una deficiencia de las otras formas intracelulares del ácido fólico.

La integración de los metabolismos descriptos se esquematiza en la Figura 3.

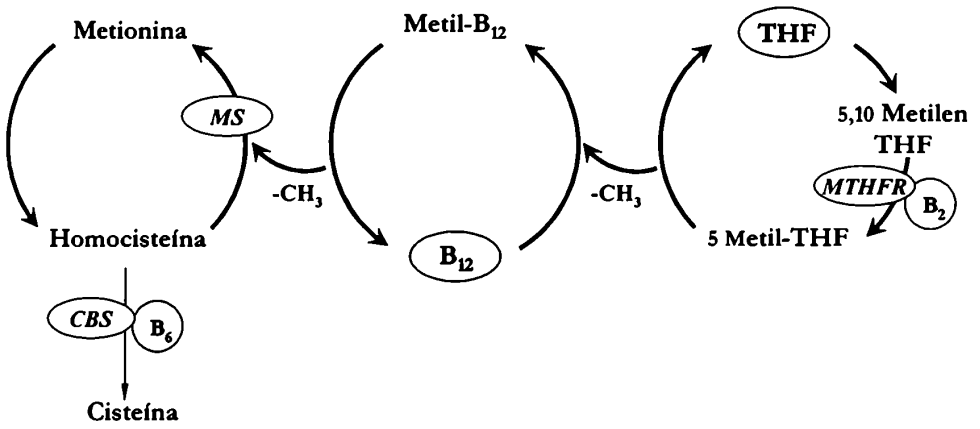


Figura 3. Interrelación entre los metabolismos de la homocisteína, vitamina B_{12} y ácido fólico.

HOMOCISTEINEMIA

La concentración de homocisteína total en sangre, ***homocisteinemia***, refleja el nivel intracelular del aminoácido y la integridad de los pasos metabólicos involucrados.

Los niveles plasmáticos de Hcy están determinados por el efecto directo o la interacción de factores genéticos y adquiridos, como así también por el sexo y la edad de los individuos. El aumento de la concentración de Hcy plasmática se denomina ***hiperhomocisteinemia*** (***HHcy***). Se han definido tres niveles de hiperhomocisteinemia:

- Leve (15 - 24 μM).
- Moderada (25 - 100 μM).
- Severa (> 100 μM).

FACTORES GENÉTICOS

Se han descripto alteraciones moleculares en las enzimas involucradas en el metabolismo de la Hcy que conducen a una actividad enzimática disminuida, incrementando los niveles plasmáticos y urinarios del aminoácido.

- ***Cistationin β-sintetasa (CβS)***

Se han descripto más de 90 mutaciones en el gen de la CβS, asociadas a homocistinuria (error congénito de herencia autosómica recesiva en el cual se observan niveles muy elevados de Hcy en plasma, > 400 μM, y en orina). Las mutaciones más comúnmente halladas son G919A y T833C, que causan las sustituciones de los aminoácidos G307S y I278T respectivamente. La primera (conocida como mutación céltica) corresponde al fenotipo más severo observado en individuos no respondedores al tratamiento con vitamina B_6, mientras que los individuos portadores de la sustitución I278T responden al tratamiento con piridoxina[20,21]. Si bien estas alteraciones genéticas son la causa principal de homocistinuria, su prevalencia es muy baja.

En los individuos heterocigotas para alguna de las mutaciones del gen de la CβS se observan grados ligeros de hiperhomocisteinemia o incluso valores de Hcy basal normal, de forma tal que la alteración sólo se pone de manifiesto con la prueba de sobrecarga de metionina.

- ***Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)***

La sustitución nucleotídica C677T en el gen de la MTHFR da como resultado una variante termolábil de la enzima. Los individuos homocigotas T/T presentan una actividad enzimática del 50 % de la molécula normal, que se relaciona con una hiperhomocisteinemia leve o moderada[22]. Sin embargo, esta asociación sólo se expresaría cuando los niveles de folato son muy bajos. La variante termolábil de la MTHFR es altamente frecuente en la mayoría de las poblaciones. En particular, la prevalencia de este polimorfismo en la Argentina es 15,8 % y 42,8 % para los portadores homocigotas y heterocigotas, respectivamente[23].

Se han descripto al menos 14 mutaciones muy poco frecuentes en el gen de la MTHFR causantes de una reducción severa de su actividad enzimática[24]. Recientemente se han caracterizado las mutaciones A1298C y T1317C, pero aún no se ha encontrado una asociación entre estas alteraciones genéticas y los niveles de Hcy[25].

- ***Metionin sintetasa (MS)***

Se ha identificado un polimorfismo frecuente que consiste en la transición A2756G, pero no se asociaría con el aumento de la concentración plasmática de Hcy[26]. Sin embargo, se han detectado defectos genéticos infrecuentes que afectarían el metabolismo de la cobalamina, a nivel de la absorción, transporte, utilización celular y formación de metilcobalamina[27]. Estas alteraciones asociadas a la metil-B_{12} influyen indirectamente en la actividad de la MS, con la consecuente acumulación de Hcy.

FACTORES ADQUIRIDOS

El nivel vitamínico, algunas patologías, el uso de ciertas drogas y los hábitos de vida son los principales factores adquiridos que regulan los niveles de homocisteína.

- ***Nivel vitamínico***

Principalmente influyen los niveles de *folatos* y de las *vitaminas* B_{12}, B_6 y B_2. Las deficiencias de la concentración plasmática de estos cofactores, involucrados en el metabolismo de la Hcy, conducen a hiperhomocisteinemia.

En particular, los déficits de folatos y cobalamina (vitamina B_{12}) son las causas más comunes de HHcy moderada a severa detectada en ayunas[28]. La deficiencia aislada de vitamina B_6 no es frecuente y refleja HHcy sólo con el *test* de sobrecarga de metionina[29].

También se ha descripto que la vitamina B_2 (riboflovina) modula la actividad de la MTHFR, lo que sugiere que esta vitamina sería otro factor nutricional con influencia sobre la homocisteinemia[17].

- ***Patologías***

Se ha encontrado que ciertas enfermedades provocan un aumento en los niveles de Hcy, siendo la más frecuente la *falla renal* [30]. Si bien se han propuestos varios mecanismos fisiopatológicos por los cuales la insuficiencia renal provocaría hiperhomocisteinemia,. aún no se han obtenido resultados concluyentes. Se postula que la HHcy se debería a una excreción renal disminuida[31] o a una inhibición de las enzimas claves del metabolismo de la Hcy, mediada por las toxinas urémicas[32]. Otra de las causas propuestas, sería la deficiencia de ácido fólico, vitamina B_6 y/o vitamina B_{12}, frecuentes en los pacientes con enfermedad renal. A su vez, estos déficits serían consecuencia de absorción disminuida, inhibición urémica del metabolismo vitamínico y de *clearance* aumentado[33].

También, la HHcy es común en ciertas enfermedades autoinmunes, tales como la *artritis reumatoidea,* en la que la alteración de la función gástrica y renal serían responsables del aumento de la Hcy[34].

Algunas enfermedades malignas provocan HHcy. Esta relación fue descripta en la *leucemia linfoblástica aguda* y en el *cáncer de mama, ovario* y *páncreas*. Se ha sugerido que las células tumorales serían incapaces de metabolizar la Hcy[35]. Además, la proliferación celular exacerbada incrementa el consumo de folato, lo que induciría el estado de HHcy. Este efecto también se encontró en pacientes con *hemólisis crónica, desórdenes mieloproliferativos* y alteraciones dermatológicas con descamación importante, como la *psoriasis* [36].

Las enfermedades gastrointestinales también pueden ser causa de la elevación de los niveles plasmáticos de Hcy. Los diversos síndromes de mala absorción serían los responsables de deficiencias de vitamina B_{12} y/o folato, por lo tanto pacientes con *colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o enfermedad celíaca*, suelen mostrar HHcy[28].

Ciertas alteraciones endocrinas también se asocian con aumento de la concentración plasmática de Hcy. En el caso de *diabetes tipo I*, sólo se ha descripto HHcy en estados avanzados, probablemente atribuida a una función renal alterada o a la deficiencia de folato y cobalamina. Tanto en la *diabetes tipo I* y *tipo II* la HHcy se asoció con la macroangiopatía de los pacientes[37]. Por otra parte, se han detectado niveles plasmáticos elevados de Hcy en pacientes con *hipotiroidismo,* debido a que estos individuos suelen presentar niveles inadecuados de folato y riboflavina y una velocidad de filtración glomerular disminuida[38].

- ***Drogas***

Una variedad de drogas utilizadas con fines terapéuticos, alteran los niveles de Hcy. Este efecto se debe a la interferencia en la absorción o en el metabolismo del folato, cobalamina o vitamina B_6. Por ejemplo, el *metotrexate* inhibe a la dihidrofolato-reductasa y de esta manera disminuye el nivel de tetrahidrofolato indispensable para el proceso de remetilación de la Hcy[39]. Algunos anticonvulsivantes, como la *fenitoína*,

provocan un consumo de los depósitos de folatos que afectaría al metabolismo de la Hcy[40]. También los anticonceptivos orales se asocian con déficit de folato[36].

La *teofilina, niacina* e *isoniazida* son antagonistas en la síntesis del fosfato de piridoxal (vitamina B_6)[41]. Los pacientes que reciben como anestesia *óxido nitroso* muestran un rápido incremento de los niveles de Hcy, ya que el fármaco oxida el cobalto presente en la molécula de cobalamina ($Co^{+1} \rightarrow Co^{+2}$), inactivando a la vitamina e inhibiendo a la metionin sintetasa[42].

- ***Hábitos de vida***

Varios factores asociados a los hábitos de vida influyen sobre los valores de homocisteinemia. Algunos de estos factores ejercen un efecto directo sobre los niveles de Hcy pero otros pueden ser variables confundidoras, que enmascaran la verdadera causa responsable del incremento de la Hcy circulante.

Dieta: La ingesta dietaria es el condicionante principal del estado nutricional o vitamínico de un individuo y por ende, de la concentración plasmática de Hcy (ya descripto).

Los hábitos alimentarios basados en el consumo de alimentos de origen animal, proveen una dosis importante de metionina. Si este tipo de dieta no es acompañada por frutas y vegetales frescos (fuente natural de ácido fólico) probablemente el nivel de folatos sea insuficiente para contrarrestar la síntesis aumentada de Hcy, generando un estado de HHcy.

Por otro lado, los vegetarianos estrictos pueden desarrollar deficiencia nutricional de vitamina B_{12}, ya que sólo los alimentos de origen animal contienen esta vitamina[43]. En este caso también estará alterado el metabolismo de la Hcy.

Otro factor relacionado a la dieta es el procesamiento de los alimentos. Las temperaturas elevadas en la cocción pueden afectar la actividad del folato y de las vitaminas B_{12} y B_6.

Alcohol: El consumo elevado de alcohol está asociado al aumento de los niveles de Hcy. Los individuos alcohólicos crónicos suelen presentar alteraciones gastrointestinales que pueden disminuir la absorción vitamínica e inducir hiperhomocisteinemia[44]. También se ha postulado un efecto directo del alcohol sobre el metabolismo de la Hcy, ya que el acetaldehído (producto de la degradación del etanol) podría ser un inhibidor de la enzima metionin-sintetasa, involucrada en el proceso de remetilación del aminoácido[45].

Cigarrillo: Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el hábito de fumar aumenta la concentración plasmática de Hcy y que ese aumento está directamente relacionado con el número de cigarrillos consumidos[46,47]. Diversos mecanismos explicarían estos hallazgos.

El tabaquismo suele asociarse a una ingesta dietaria inapropiada, con bajo contenido de folatos y de vitaminas B_{12} y B_6. Además, se ha descripto que los fumadores muestran niveles bajos de estos cofactores, independientemente de la dieta y por causas aún no esclarecidas[48,49].

Por otro lado, el humo del tabaco contiene una alta concentración de radicales libres, afectando así el estado redox de los tioles, en particular el de la Hcy[50]. Se encontró que en fumadores, la fracción de Hcy reducida (principal especie responsable del efecto perjudicial) es significativamente mayor que en individuos no fumadores[51].

Café: Se ha reportado que el consumo de café sería uno de los determinantes relacionados al estilo de vida de mayor influencia sobre la homocisteinemia[52]. Aún el consumo moderado, provocaría HHcy[53].

Similarmente al hábito de fumar, beber café se ha asociado a una nutrición inadecuada, con el consecuente déficit vitamínico. Además, la cafeína estaría involucrada en el aumento de la Hcy plasmática, porque afectaría la función renal y la actividad de la vitamina B_6[41].

Actividad física: Este factor ejercería un efecto leve sobre los niveles de Hcy. Se observó que los individuos con estilo de vida sedentaria muestran valores de homocisteinemia significativamente más altos que los que practican diariamente ejercicio físico (especialmente sujetos mayores de 65 años)[54].

EDAD - SEXO

Los niveles plasmáticos de Hcy aumentan con la *edad* de los individuos[54]. En particular, se observó que en sujetos mayores de 65 años aumenta la prevalencia de hiperhomocisteinemia. Este incremento se atribuye al deterioro de la función renal, a niveles vitamínicos subóptimos generalmente asociados a una mala absorción intestinal, y a una mayor incidencia de condiciones crónicas, como enfermedades reumáticas y malignas (descripto anteriormente)[55].

El *sexo* también influye sobre la Hcy plasmática. En numerosas poblaciones se ha detectado que el valor promedio de homocisteinemia de los hombres es mayor que el de las mujeres[54], aunque después de la *menopausia* los valores son semejantes en ambos sexos[56]. Estos hallazgos se deberían al efecto de hormonas sexuales, aunque aún no se han esclarecido los mecanismos involucrados.

Durante el *embarazo* se observa una reducción importante (alrededor del 50%) de los valores de Hcy[57]. Esta disminución se debería no sólo al nivel de folatos (generalmente elevado por la suplementación de ácido fólico a las mujeres embarazadas) sino también a una absorción fetal de la Hcy materna[58].

En conclusión, el valor de homocisteinemia es la resultante del efecto directo de diversos factores y de la interacción entre los mismos. En algunos casos, parámetros asociados con los niveles de Hcy no constituyen factores determinantes de los mismos, sino variables aparentes o "confundidoras" que enmascaran las causas verdaderas (Figura 4).

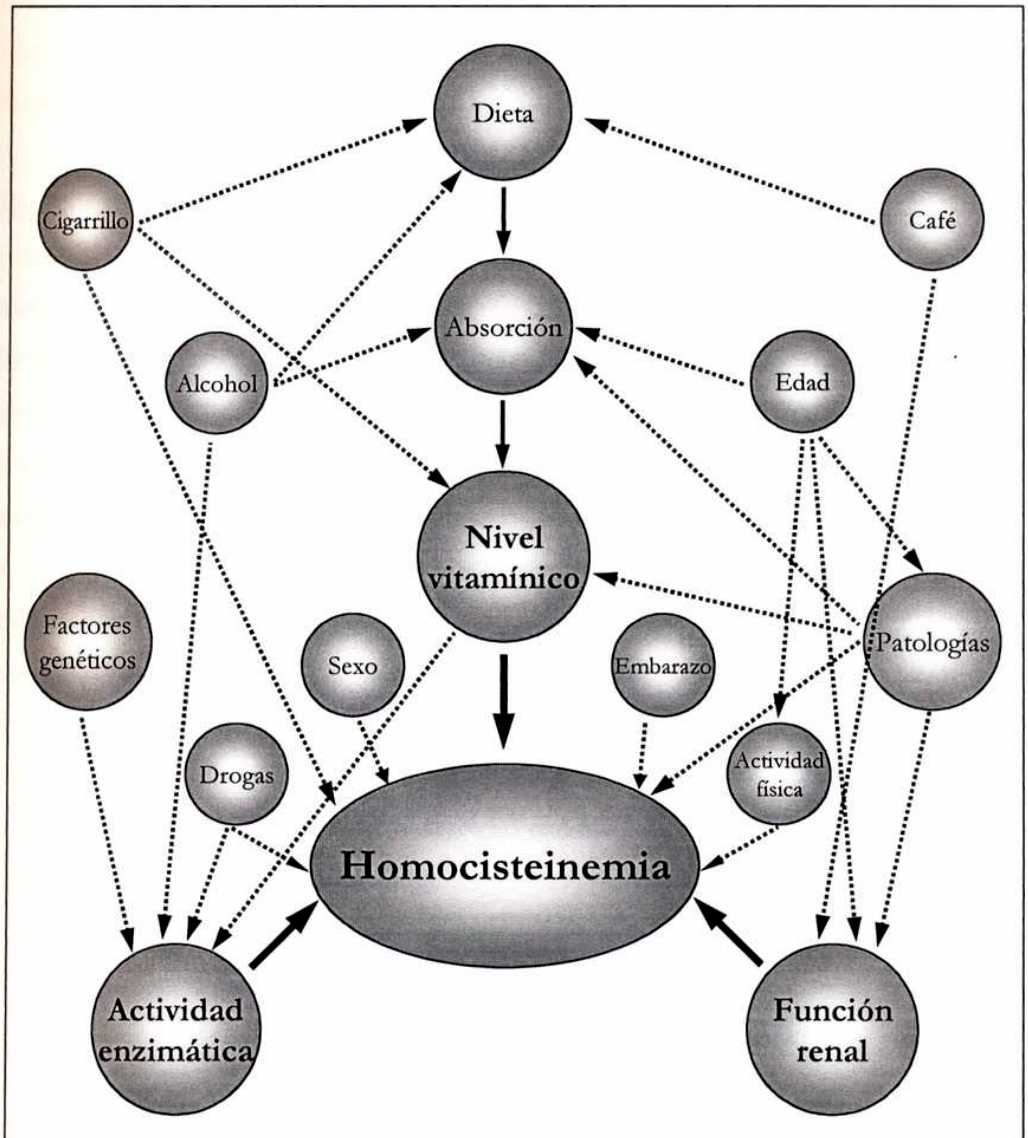


Figura 4. Factores determinantes de los niveles de homocisteína plasmática.

DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEÍNA

- ***Muestras***

La homocisteína puede determinarse en los diferentes fluidos biológicos, siendo de interés clínico el dosaje en sangre y en orina.

La determinación en sangre puede realizarse a partir de plasma o suero. El anticoagulante recomendado y utilizado en la mayoría de los estudios clínicos y epidemiológicos es el EDTA. Una vez extraída la sangre, las diferentes células sanguíneas y en particular los eritrocitos, siguen produciendo y liberando Hcy al medio[59]. A temperatura ambiente, este incremento artificial de la concentración de Hcy es aproximadamente de 1 μmol/l por hora. Por lo tanto la muestra de plasma o suero debe ser separada del paquete globular inmediatamente o colocarla en hielo por un lapso menor a 4 horas, hasta su posterior procesamiento. Luego de la centrifugación, la estabilidad de la Hcy plasmática o sérica es de cuatro días a temperatura ambiente; de varias semanas, entre 0 °C y 2 °C y por años a –20 °C [60].

Otros anticoagulantes propuestos son la heparina con el agregado de NaF o el citrato ácido. Si bien estos sistemas inhibirían la liberación de Hcy desde los glóbulos rojos[61], aún no se han obtenido resultados concluyentes[62,63].

Existen diversas fuentes de variación preanalítica en la determinación de Hcy. Entre ellas, condiciones inherentes a la muestra tales como el efecto postprandial y ortostático, el anticoagulante utilizado y las condiciones de procesamiento, influyen en el resultado final[64]. Para minimizar estos efectos es necesario estandarizar el procedimiento de muestreo.

Prueba en ayunas: Se recomienda un ayuno mínimo de 8 horas y evitar los alimentos de alto contenido proteico en la última ingesta. En condiciones óptimas, la concentración plasmática de homocisteína oscila entre 5 y 15 μM [60]; sin embargo estudios recientes postulan que el valor normal debe ser ≤ 12 μM e incluso ≤ 10 μM [65,66].

Prueba de sobrecarga con metionina: A través de varios estudios epidemiológicos se ha observado que un porcentaje importante de individuos (25 al 40%) muestran valores de homocisteinemia elevados cuando son sometidos a la prueba de sobrecarga de metionina[66,67]. Esta prueba muestra los cambios fisiológicos postprandiales de los niveles de Hcy plasmática y pone de manifiesto, principalmente, alteraciones genéticas o adquiridas de los componentes de la vía de la transulfuración. En cambio, defectos en la remetilación pueden detectarse aún con el análisis en ayunas. La prueba de sobrecarga consiste en la administración oral de 100 mg de metionina/kg de peso corporal después de 8 horas de ayuno y la determinación de la homocisteína antes y después de 4 ó 6 horas de la sobrecarga[68].

En condiciones normales se encuentra que los valores de Hcy son dos o tres veces mayores que los que se obtienen en ayunas[69].

La prueba de sobrecarga con metionina se recomienda en pacientes con complicaciones obstétricas previas o en individuos con episodios aterotrombóticos que presenten valores normales de homocisteinemia en ayunas.

También la Hcy puede determinarse en orina. Generalmente, esta determinación se utiliza para el diagnóstico de homocistinuria[70]. Se ha encontrado que los niveles de orina reflejan los cambios observados en la concentración plasmática. Presenta la ventaja que la toma de muestra es una técnica no invasiva, útil especialmente en niños.

La concentración de Hcy en orina se expresa como $\mu mol/mmol_{creatinina}$. Si bien existen pocos estudios epidemiológicos que evalúen la concentración urinaria de Hcy, se ha determinado que el valor promedio para individuos sanos sería 1,26 y 1,95 $\mu mol/mmol_{creatinina}$, para mujeres y hombres respectivamente[71].

- ***Métodos***

Las técnicas para la cuantificación de los niveles de Hcy se han desarrollado principalmente para la determinación en sangre (plasma o suero), aunque la mayoría también pueden utilizarse para el dosaje en orina.

En el plasma humano la Hcy se encuentra en formas diferentes. Aproximadamente el 80% de la Hcy está ligada covalentemente por uniones disulfuros a proteínas plasmáticas; un poco menos del 20% se une a tioles de bajo peso molecular, formando dímeros y una fracción muy baja se encuentra como Hcy libre o reducida[50]. Si bien existen equilibrios dinámicos entre todas las distintas estructuras, la sumatoria de las mismas es constante y representa a la Hcy total (tHcy), cuya concentración es la que interesa conocer. Para obtener resultados reproducibles, la tHcy debe determinarse bajo la forma de Hcy reducida. Por lo tanto en la mayoría de los casos, el dosaje de homocisteinemia requiere un tratamiento previo al análisis propiamente dicho:

Reducción de los puentes disulfuros que unen a la Hcy con otros tioles o con albúmina. De esta manera, todas las formas en que se encuentra la Hcy son convertidas en Hcy libre y el valor hallado será el correspondiente a la Hcy total. Algunos agentes reductores utilizados son: 2-mercaptoetanol, ditioeritritol, ditiotreitol y borohidruro de sodio o potasio.

Precipitación de las proteínas plasmáticas mediante los ácidos tricloroacético, sulfosalicílico, perclórico, etc.

Centrifugación y filtración. De esta manera se obtiene un sobrenadante correspondiente a la fracción a analizar. En la mayoría de los casos, con la solución obtenida se procede a la *derivatización.* Este es un procedimiento mediante el cual los analitos son convertidos en sustancias más estables y con mejores propiedades de separación y sensibilidad.

Se han desarrollado varios métodos para proceder al análisis cuantitativo de la Hcy presente en plasma, suero u orina:

Ensayos radioenzimáticos: Las primeras determinaciones de Hcy en fluidos biológicos se realizaron mediante ensayos radioenzimáticos, basados en la conversión de Hcy a S-adenosilhomocisteína en presencia de ^{14}C adenosina y S-adenosilhomocisteína hidrolasa. El compuesto radioactivo obtenido fue separado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) y cuantificado por centelleo. Este ensayo también puede llevarse a cabo con adenosina no marcada y detección ultravioleta a 254 nm.

Esta técnica es sensible y específica. Su principal desventaja es que requiere un proceso manual muy laborioso[72].

Cromatografía gaseosa - espectrometría de masa (GC-MS: Gas Chromatography - Mass Spectrometry): Este método se desarrolla en varios pasos. La reducción se realiza por medio de ditiotreitol y la derivatización con N-metil-n-trifuoroacetamida; además se deben incorporar patrones de referencia deuterados. Los compuestos derivatizados son separados por cromatografía gaseosa capilar y la detección se realiza mediante espectrometría de masa. Es una técnica de alta sensibilidad y especificidad. Permite dosar varios compuestos simultáneamente: cisteína, metionina, cistationina, N,N-dimetilglicina y N-metilglicina[73].

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography): Esta técnica ha sido la más difundida y desarrollada internacionalmente; es de alta sensibilidad y selectividad. Para la cuantificación de la muestra, es necesario acoplar la detección por fluorescencia, por ultravioleta o electroquímica.

Detección por fluorescencia

Las sustancias que se usan comúnmente para derivatizar a la Hcy y obtener compuestos fluorescentes son: monobromobimano (mBrB) y amonio 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonato (SBD-F). La inyección en la columna del aparato de HPLC puede realizarse en forma manual o automática. La separación de los componentes de

la muestra se realiza, generalmente, mediante un gradiente de concentraciones de los solventes utilizados. Esta también es una técnica de alta sensibilidad y especificidad[74].

Detección por ultravioleta

En esta metodología la separación se lleva a cabo isocráticamente (concentración constante del solvente de elución). La derivatización se realiza con 4,4-ditiodipiridina y, a diferencia del método anterior, la conjugación se produce después del pasaje por la columna. La detección es por luz ultravioleta[75].

Detección electroquímica

Con esta metodología no es necesario derivatizar la muestra. El eluido de la columna es detectado por un electrodo de oro-mercurio, el que muestra gran especificidad por los tioles. Este método electroquímico presenta varias características importantes: procesamiento simple de la muestra, especificidad, autoinyección, tiempos cortos de corrida y la posibilidad de determinar otros tioles además de la Hcy. La desventaja de esta técnica es la fácil contaminación y deterioro del electrodo, por lo tanto la reproducibilidad del método dependerá del mantenimiento del sistema de detección[76].

Analizador de aminoácidos: La determinación de Hcy por un analizador de aminoácidos convencional ha sido optimizada, usando ditiotreitol como agente reductor. De esta manera no es necesario realizar una derivatización previa. La detección se realiza por medio de una reacción con ninhidrina. Este método también mide metionina y cistationina. El tiempo de retención de la Hcy y el de regeneración de la columna son prolongados, lo que limita la capacidad de análisis. Es una técnica de baja selectividad y sensibilidad.

Inmunoensayos: La Hcy es convertida enzimáticamente a S-adenosilhomocisteína (SAH). Con el agregado de un anticuerpo monoclonal anti-SAH se mide la cantidad de SAH mediante un *enzimoinmunoensayo (ELA)* competitivo entre la SAH de la muestra y la SAH

unida al medio soporte[77]. Basado en estos principios se desarrolló el *inmunoensayo de fluorescencia polarizada (FPIA)*, en el que la SAH compite con el compuesto análogo fluoresceinado de SAH, por la unión al anticuerpo monoclonal. Es una técnica totalmente automatizada, de alta precisión[78].

Electroforesis capilar: Es un método de gran poder de separación. Para el estudio de aminotioles se utiliza con detección de fluoresceína inducida por láser. La Hcy reacciona con 5-bromemetil fluoresceína, generando un compuesto fácilmente detectable. Se utilizan volúmenes muy pequeños de muestra y solvente[79].

Si bien existe una buena correlación entre los distintos métodos, aún no se han obtenido resultados completamente equivalentes entre los mismos.

EVIDENCIAS CLÍNICAS ASOCIADAS CON HIPERHOMOCISTEINEMIA

En 1969, Kilmer Mc Cully fue el primer científico que postuló la relación entre los niveles elevados de Hcy y la enfermedad vascular aterosclerótica, en pacientes con homocistinuria[80]. En 1976, D. Wilcken reportó el primer estudio caso-control que demostró la asociación entre HHcy moderada y la enfermedad arterial coronaria[81]. Recién a principios de 1990 comenzaron los estudios epidemiológicos a gran escala, debido a la introducción de métodos analíticos para el dosaje de homocisteinemia, reproducibles y accesibles para el laboratorio de rutina.

Durante la última década se han realizado más de 100 estudios transversales, caso-control y de cohorte prospectivos para evaluar las implicancias clínicas de la HHcy. Se ha demostrado que aún la HHcy leve y moderada (15 - 100 μM) están asociadas a enfermedades vasculares (arterial y venosa), alteraciones neurosiquiátricas, complicaciones obstétricas y a efectos teratogénicos.

- ***Enfermedad vascular***

A continuación se resumen los estudios más importantes que han investigado la relación entre HHcy y la *enfermedad vascular oclusiva*, a nivel *arterial* (Tabla 1) y *venoso* (Tabla 2).

De los estudios epidemiológicos relacionados con la enfermedad arterial oclusiva, cabe destacar el trabajo de Boushey y colaboradores[82]. Se trata de un meta-análisis de 27 estudios observacionales, que incluyó aproximadamente 4.000 pacientes. Los resultados mostraron que los niveles elevados de Hcy constituyen un importante factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular aterosclerótica, a nivel coronario, cerebral y periférico. La magnitud del riesgo resultó similar a la de otros factores tales como hipercolesterolemia, tabaquismo, hipertensión y diabetes. Además se calculó que un

incremento de 5 μM en la concentración plasmática de Hcy confiere el mismo aumento de riesgo coronario (≅ 40%) que un incremento de 0,5 mM en los niveles de colesterol.

Otro estudio relevante es el de Graham *et al.* [66]. Se trata de un trabajo multicéntrico en nueve países de Europa. Se evaluaron 750 pacientes con enfermedad vascular y 800 controles. Este estudio confirmó que la HHcy confiere un riesgo elevado de sufrir enfermedad vascular y factores tales como la hipertensión y el tabaquismo ejercen un efecto multiplicativo cuando se combinan con la HHcy. Además, demostró que con la prueba de sobrecarga con metionina pueden detectarse entre 20% y 30% de casos adicionales de HHcy.

Tabla 1. Estudios Epidemiológicos. Enfermedad arterial oclusiva.

Año	*Autores*	*Diseño*	n_t	*Asociación*
1992	Stampfer *et al.*[1]	Prospectivo	542	+ IM
1993	Malinow *et al.*[83]	Transversal	574	+ Est.Car.
1994	Alfthan *et al.*[84]	Prospectivo	134	- IM/ACV
1995	Perry *et al.*[85]	Prospectivo	107	+ ACV
1995	Arnesen *et al.*[86]	Prospectivo	122	+ EC
1995	Boushey *et al.*[82]	Meta–Análisis	4.000	+ EV
1995	Hopkins *et al.*[87]	Retrospectivo	317	+ EV
1995	Selhub *et al.*[88]	Transversal	1.041	+ EV
1996	Chasan-Taber *et al.*[89]	Prospectivo	333	- IM
1996	Malinow *et al.*[90]	Retrospectivo	941	+ IM
1997	Verhoef *et al.*[91]	Prospectivo	149	- EC
1997	Graham *et al.*[66]	Caso-Control	1.550	+ EV
1997	Nygard *et al.*[92]	Prospectivo	1.174	+ IM/Mortalidad
1997	Evans *et al.*[93]	Caso-Control	712	- IM
1998	Folsom *et al.*[94]	Prospectivo	769	- EC
1998	Wald *et al.*[95]	Prospectivo	1.355	+ IM/Mortalidad
1999	Bots *et al.*[96]	Prospectivo	757	+ IM/ACV
2000	Voutilainen *et al.*[97]	Prospectivo	326	- EC
2000	Morris *et al.*[98]	Prospectivo	2.204	+ IM/ACV
2001	Fallon *et al.*[99]	Prospectivo	3.538	- EC
2001	Vollset *et al.*[100]	Prospectivo	4.766	+ Muerte EC

IM: infarto de miocardio; ACV: accidente cerebro-vascular; EC: enfermedad coronaria; EV: enfermedad vascular; Est.Car: estenosis carotídea.

En cuanto a los trabajos que relacionan la concentración plasmática de Hcy con la enfermedad venosa oclusiva, la mayoría han demostrado una asociación positiva. Esta relación fue confirmada por el meta-análisis llevado a cabo por Ray y colaboradores[101], que incluyó a 9 estudios de caso-control.

Tabla 2. Estudios Epidemiológicos. Enfermedad venosa oclusiva.

Año	*Autores*	*Diseño*	n_t	*Asociación*
1994	Falcon *et al.*[102]	Caso-Control	119	+ TV*/ + TEP
1995	Fermo *et al.*[103]	Caso-Control	118	+ TV*/ + TEP
1995	Den Heijer *et al.*[104]	Caso-Control	405	+ $TVP_{(r)}$
1996	Den Heijer *et al.*[105]	Caso-Control	538	+ $TVP_{(1^{er})}$
1996	Petri *et al.*[106]	Prospectivo	337	- TV
1997	Ridker *et al.*[107]	Prospectivo	791	+ TEV
1998	Eichinger *et al.*[108]	Prospectivo	264	+ $TEV_{(r)}$
1998	Ray *et al.*[101]	Meta-Análisis	2.268	+ TEV
2000	Langman *et al.*[109]	Caso-Control	280	+ TEV
2001	Hsu *et al.*[110]	Caso-Control	202	+ TVP

TV*: Todo tipo de trombosis venosa; TEP: Tromboembolismo pulmonar ; $TVP_{(1^{er})}$: Trombosis venosa profunda (primer episodio); $TVP_{(r)}$: Trombosis venosa profunda (recurrente); TEV: Tromboembolismo venoso.

Si bien existen numerosos trabajos que demuestran la relación entre niveles elevados de Hcy y el infarto de miocardio, accidente cerebro vascular, engrosamiento de la carótida, trombosis venosa, etc.; se reportan otros estudios que no encuentran asociación significativa entre la Hcy y la enfermedad vascular. Sin embargo, estos últimos estudios son menos numerosos y evalúan menor número de individuos que los primeros. Además, es probable que en algunos casos las conclusiones sean sólo aparentemente opuestas. Es decir, para realizar una comparación válida entre los diferentes trabajos y arribar a conclusiones consistentes, deberían evaluarse estudios que analicen poblaciones similares, con métodos analíticos para homocisteinemia iguales y el mismo tipo de desenlace. Además, también debe tenerse en cuenta el diseño metodológico del trabajo, ya que estudios retrospectivos o transversales son menos rigurosos que, por ejemplo, los de cohorte.

Por lo tanto, las consideraciones enunciadas advierten acerca de la validez de algunas conclusiones contradictorias que surgen de los diferentes estudios epidemiológicos. De todas maneras, queda planteado el interrogante de que si la hiperhomocisteinemia es agente responsable del incremento en el riesgo de la enfermedad vascular oclusiva o si sólo es un marcador de otro factor asociado a dicho riesgo.

Para resolver esta disyuntiva es necesario disponer de los datos que surjan de estudios clínicos prospectivos y randomizados, que demuestren que el descenso de los niveles plasmáticos de Hcy disminuye la incidencia de la enfermedad vascular. Con este objetivo, actualmente están en curso varios estudios de intervención terapéutica. Se trata de trabajos clínicos a gran escala, que proveen un tratamiento adecuado (generalmente basados en ácido fólico combinado con vitamina B_{12} y/o vitamina B_6), durante un período suficiente.

Los estudios más importantes[111] se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Estudios de intervención terapéutica en curso.

	Estudio	*País*	*n*
VISP	Vitamin Intervention for Stroke Prevention	Estados Unidos	3.600
WACS	Women's Antioxidant and Cardiovascular disease Study	Estados Unidos	6.000 – 8.000
SEARCH	Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine	Inglaterra	12.000
CHAOS-2	Cambridge Heart AntiOxidant Study – 2	Inglaterra	4.000
NORVIT	Norwegian Study of Homocysteine Lowering with B-Vitamins in myocardial infarction	Noruega	3.000
WENBIT	Western Norway B Vitamin Trial	Noruega	2.000
PACIFIC	Prevention with A Combined Inhibitor and Folated in Coronary heart disease	Australia	10.000
HOPE-2	Heart Outcomes Prevention Evaluation-2 Study	Canadá	5.000
VITRO	Vitamins and Thrombosis	Holanda-Austria-Italia	620

La mayoría de estos trabajos evalúan sujetos con enfermedad coronaria previa o con alto riesgo de enfermedad cardíaca, con excepción de los estudios VISP y VITRO.

En el caso del VISP, se trata de pacientes que padecieron, al menos, un episodio de accidente cerebrovascular (ACV) y en el estudio VITRO, están incluidos aquellos individuos que sufrieron trombosis venosa profunda (TVP) o tromboembolismo pulmonar (TEP).

Los pacientes de cada proyecto serán evaluados con el mismo punto final. Por lo tanto, según el estudio a que pertenezcan, se analizará:

- Evolución de la enfermedad coronaria o muerte por enfermedad cardíaca.
- Nuevos episodios de ACV.
- Nuevos episodios de TVP o TEP.

Cuando estos trabajos finalicen se podrá disponer de evidencia confiable para determinar si el descenso de los niveles de homocisteinemia reduce el riesgo de aterotrombosis y por ende dilucidar la verdadera asociación entre Hcy y la enfermedad vascular.

- ***Alteraciones neurosiquiátricas***

También se ha encontrado que una concentración elevada de Hcy plasmática estaría relacionada con alteraciones neurosiquiátricas tales como depresión, demencia (en particular la enfermedad de Alzheimer), esquizofrenia, síndrome de fatiga crónica y enfermedad de Parkinson[112,113,114,115].

La asociación entre la hiperhomocisteinemia y las patologías mencionadas, apoyaría la hipótesis de que la enfermedad vascular es un factor que contribuye en las patogénesis de algunas de aquellas afecciones[116].

En el caso de la enfermedad de Parkinson, aún se desconoce si el aumento de los niveles de Hcy se debe a una alteración metabólica endógena o por el tratamiento con L-dopa[117].

- ***Embarazo y complicaciones obstétricas***

A través de numerosos ensayos clínicos se ha estudiado la posible asociación entre los niveles plasmáticos de Hcy y la evolución del embarazo. Uno de los trabajos más relevantes es el de Vollset y colaboradores, que evaluaron 5.883 mujeres y 14.492 embarazos (en la misma población). Se encontró que la hiperhomocisteinemia incrementaría el riesgo de desarrollar preeclampsia, anormalidades placentarias y sufrir pérdidas fetales recurrentes[118,119].

Además, se ha descripto que la concentración plasmática elevada de Hcy se asocia con malformaciones congénitas, principalmente con defectos del tubo neural. Sin embargo, aún no se ha esclarecido si la HHcy es causa de esas deformaciones, o si se trata de un marcador sensible de las deficiencias de folatos o vitamina B_{12}, involucrados en los procesos de metilación, y probablemente, verdaderos responsables de los efectos teratogénicos[120].

MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA HIPERHOMOCISTEINEMIA

Los estudios clínicos y epidemiológicos descriptos muestran la relación entre una concentración elevada de Hcy plasmática y la enfermedad vascular, las alteraciones neurosiquiátricas, los efectos teratogénicos y/o las complicaciones obstétricas. Con el fin de dilucidar los mecanismos fisiopatológicos involucrados en estas asociaciones, se ha realizado un número importante de estudios *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales, aunque aún no se han obtenido resultados concluyentes.

La mayoría de estas experiencias han utilizado concentraciones de Hcy muy elevadas (1 a 10 mM), las que representan valores muy superiores a los fisiopatológicos, aún a los detectados en pacientes con HHcy severa. Además, no se ha esclarecido si los efectos observados son específicos de la Hcy o si también podrían ser ejercidos por otros compuestos sulfurados. Si bien deben considerarse estas observaciones, los estudios coinciden en postular que la HHcy induciría directa o indirectamente efectos aterogénicos y protrombóticos, responsables de la mayoría de las evidencias clínicas reportadas.

MECANISMOS ATEROGÉNICOS

Las evidencias experimentales sugieren que los efectos aterogénicos asociados con la HHcy resultarían de la disfunción e injuria endotelial, mediada fundamentalmente por el *daño oxidativo* [121]. La Hcy ejercería una acción tóxica directa sobre el endotelio o a través de la generación de otras moléculas.

Se ha demostrado que la Hcy sufre auto- oxidación uniéndose a proteínas o convirtiéndose en los dímeros Hcy-Hcy y Hcy-Cys o en Hcy-tiolactona (éster cíclico). En este proceso se generan especies oxigenadas altamente reactivas, tales como peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos y superóxidos[122].

En condiciones normales, la glutation peroxidasa es la enzima convertidora de las moléculas oxigenadas en el alcohol correspondiente. En presencia de niveles elevados de

Hcy se ha demostrado que disminuye la actividad enzimática, con la consecuente acumulación de las especies tóxicas[123]. Otra enzima afectada por la Hcy sería la superóxido dismutasa (SOD), secretada por las células de músculo liso y cuya función es la de proteger la pared vascular del estrés oxidativo. Reportes recientes han demostrado que la Hcy reduce la secreción y expresión de la SOD, contribuyendo al daño oxidativo[124].

Los radicales hidroxilos y superóxidos serían responsables de la peroxidación lipídica y oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), involucradas en la patogénesis de la aterosclerosis[125]. Además, cuando se produce un exceso de Hcy-tiolactona se formarían aductos con las partículas de LDL, los que son fagocitados por los macrófagos e incorporados a las células espumosas, favoreciendo la aparición de las placas de ateroma[35]. Estudios recientes han demostrado que la Hcy incrementaría la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, estimulando la producción y secreción de colesterol[126].

También se ha propuesto que una concentración elevada de Hcy afectaría la *vasodilatación* del endotelio, mediada por el óxido nítrico (NO) o Factor Relajante Derivado del Endotelio. El NO ejerce un importante efecto vasodilatador y antiagregante plaquetario. Además, neutraliza la acción potencialmente tóxica de la Hcy, por la formación de S-nitroso-homocisteína (SNHcy), también de acción vasodilatadora. Sin embargo, cuando la concentración de Hcy excede los valores normales, se postula que disminuiría la biodisponibilidad del NO, probablemente por un consumo exacerbado[127]. Estudios recientes han reportado que en condiciones de hiper-homocisteinemia, se incrementaría la actividad de las metaloproteinasas de la matriz extracelular, asociada con una disminución en la producción de NO[128].

Otro de los efectos de la Hcy relacionados con la aterosclerosis es su *acción mitogénica.* Experiencias con cultivos celulares han mostrado que la Hcy induce la proliferación y migración de las células musculares lisas de la pared vascular. Se ha postulado que la Hcy estimularía directamente la proliferación de estas células mediante un incremento en la síntesis de ADN o en la expresión del ARN mensajero de la ciclina

A. Además, el efecto mitogénico también se ejercería indirectamente, ya que la Hcy induciría la activación de la transcripción del factor nuclear κB (NF-κB), esencial para el crecimiento de las células de músculo liso. Otra acción indirecta es la que resulta cuando la Hcy satura la actividad del NO, ya que este compuesto no sólo es vasodilatador sino que también inhibe la proliferación de células musculares lisas[129].

Se ha planteado que la Hcy también podría afectar las propiedades elásticas de la pared arterial por el aumento en la síntesis de las fibras de colágeno y la alteración del entrecruzamiento de las mismas[130].

Otro de los procesos involucrados en la patogénesis del daño vascular es la *hipometilación* resultante en condiciones de hiperhomocisteinemia. En esta situación aumenta la concentración de SAH (S-adenosilhomocisteína), inhibidor competitivo de metiltransferasas. Este grupo de enzimas cataliza la transferencia del grupo metilo de la SAM (S-adenosilmetionina) a varios sustratos aceptores tales como proteínas, lípidos, mielina, DNA, etc. Por lo tanto, la inhibición de estas reacciones puede alterar el crecimiento normal de la célula endotelial, la reparación de proteínas dañadas y otras funciones celulares importantes[131].

MECANISMOS TROMBOGÉNICOS

Varios de los efectos sobre el endotelio, ejercidos por niveles elevados de Hcy, contribuyen al desarrollo de un estado protrombótico. En particular, cuando se altera la regulación vasomotora del endotelio y se exponen los componentes de la matriz subendotelial por injuria vascular, se induce la activación plaquetaria, desencadenándose eventos que conducen a la formación del trombo.

En condiciones normales, el organismo mantiene la fluidez de la sangre y la integridad vascular, a través del mecanismo hemostático. Para llevar a cabo su función, intervienen diversos componentes: pared vascular, plaquetas, sistema de coagulación, sistema fibrinolítico e inhibidores fisiológicos (tanto de la coagulación como de la fibrinolisis). Además, en la función hemostática también intervienen indirectamente otros sistemas enzimáticos plasmáticos (complemento, calicreína-quininas y renina-

angiotensina); factores reológicos (velocidad y viscocidad de la sangre) y células sanguíneas (hematíes y leucocitos).

Existen factores genéticos y adquiridos que pueden alterar el delicado equilibrio de la hemostasia, conduciendo a episodios trombóticos o hemorrágicos.

Según lo descripto, los niveles elevados de Hcy afectarían el sistema hemostático, generando un estado protrombótico.

- ***Plaquetas***

La injuria endotelial inducida por la HHcy sería responsable de una activación de las plaquetas, aunque los resultados de los estudios *in vitro* y *ex vivo* son contradictorios respecto a las funciones plaquetarias tales como adhesividad y agregación.

Estudios en pacientes homocistinúricos han demostrado un incremento en la biosíntesis del tromboxano A2 (TXA2), reflejado por los valores elevados de los metabolitos urinarios 11-dehidro-tromboxanoB2 y 2,3-dinor-tromboxanoB2. Dado que el TXA2 es un potente agonista plaquetario y vasoconstrictor, un incremento en su síntesis postularía uno de los probables mecanismos trombogénicos asociados a la hiperhomocisteinemia[132].

- ***Coagulación / Fibrinolisis***

Los estudios *ex vivo* en pacientes con homocistinuria han demostrado varias alteraciones en el sistema de coagulación, sugiriendo un estado hipercoagulable en estos individuos: Se ha reportado un aumento significativo en la concentración de marcadores de activación, como los complejos trombina-antitrombina (TAT) y fragmento de protrombina 1+2 (F1+2). En cambio, se registraron niveles disminuidos de inhibidores fisiológicos de la coagulación, tales como antitrombina (AT) y proteína C (PC)[133].

Además, se han realizado numerosos estudios *in vitro* que confirmarían que el aumento de las concentraciones de Hcy en plasma favorece un estado protrombótico. Principalmente, se llevaron a cabo experiencias con cultivos celulares, demostrando un aumento de la actividad del Factor XII y Factor V del sistema de coagulación[134,135].

También se reportó un aumento de la actividad del factor tisular (TF), mediante un efecto dosis-dependiente de la Hcy sobre el RNA mensajero de la proteína[136].

Se encontró que una concentración elevada de Hcy inhibe la síntesis de heparán sulfato (HS), principal activador de la antitrombina (AT). Además, el peróxido de hidrógeno generado por la auto-oxidación de la Hcy, afectaría la unión del complejo AT-HS, disminuyendo su capacidad anticoagulante[137]. Otro de los sistemas de inhibición de la coagulación que mostró alteraciones es el de la proteína C. Se reportó que la Hcy ejerce un efecto inhibitorio sobre el complejo trombomodulina-trombina, necesario para activar a la proteína C. Esta inhibición se debería a un descenso de los niveles de la trombomodulina nativa (por reducción de puentes disulfuros de la molécula) y de la capacidad de unión de la trombomodulina reducida a la trombina[138].

Respecto a la interferencia de la Hcy con los componentes del sistema fibrinolítico se ha demostrado una disminución importante en la actividad del activador tisular del plasminógeno (t-PA).

Se reportó que la anexina II, involucrada en la unión del t-PA a la célula endotelial, también es ligando para la Hcy a través del mismo dominio de unión, bloqueando así la acción del activador y probablemente la conversión de plasminógeno a plasmina[139].

Otro efecto potencial de la Hcy sobre la fibrinolisis involucra a la lipoproteína(a) [Lp(a)]. Debido a la homología que presenta esta proteína con el *kringle* IV del plasminógeno, la Lp(a) compite con el Plg por los sitios de unión a la fibrina, inhibiendo el proceso fibrinolítico. Se postuló que la Hcy reduciría las uniones disulfuros de la molécula de Lp(a), lo que induciría un aumento en su capacidad de unión a la fibrina[140].

En conclusión, los estudios experimentales realizados hasta el momento muestran que la Hcy estaría involucrada en una serie de mecanismos potencialmente reponsables de un aumento de la activación plaquetaria y del sistema de coagulación, alterando además, funciones antitrombóticas del endotelio, de los inhibidores fisiológicos y del sistema fibrinolítico. Estos hallazgos conducirían a un estado hipercoagulable, apoyando los resultados de los estudios clínicos.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido estudiar la acción de la homocisteína sobre componentes del sistema hemostático, a través de dos líneas principales de investigación: estudios experimentales *in vitro* y estudios epidemiológicos.

Objetivos específicos

- Optimizar las fases pre-analítica y analítica para el dosaje de homocisteína plasmática.
- Determinar los niveles de homocisteína plasmática en una población normal.
- Evaluar factores adquiridos y genéticos, determinantes de la homocisteinemia.
- Estudiar las asociaciones entre los niveles de homocisteína y otros analitos fisiológicos.
- Determinar los valores de corte para homocisteinemia.
- Estudiar la asociación del polimorfismo C677T de la MTHFR con episodios trombóticos.
- Evaluar la acción de la homocisteína sobre componentes de sistema hemostático.
- Postular mecanismos fisiopatológicos responsables de la acción trombogénica de la homocisteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Para el desarrollo de la presente tesis se utilizaron diferentes muestras obtenidas a partir de sangre venosa. En todos los casos se extrajo sangre a voluntarios humanos con 8 o 12 horas de ayuno, según correspondiera. Para la evaluación de los parámetros fibrinolíticos las extracciones de sangre se realizaron, estrictamente, a individuos en reposo, entre las 8 y 9 hs. de la mañana, con el menor estasis venoso posible.

A continuación se describe la obtención de las muestras sanguíneas utilizadas:

- *Plasma en EDTA:* Se recolectaron 2,5 ml de sangre en tubos plásticos conteniendo como anticoagulante 61 µl de una solución 7,5 % de K_3EDTA (sal tripotásica del ácido etilendiamintetraacético). Las muestras se centrifugaron a 2.000 *g* durante 10 minutos. Para la determinación de homocisteinemia, los plasmas se separaron inmediatamente del paquete celular o, en su defecto, las muestras de sangre se mantuvieron en baño de hielo por un lapso menor a 4 horas.

- *Plasma en citrato de sodio:* Se recolectó la sangre en tubos plásticos conteniendo citrato trisódico 3,8 % en una relación de nueve partes de sangre y una parte de anticoagulante.
Para la determinación de pruebas de coagulación y fibrinolisis las muestras se sometieron a doble centrifugación (2.500 x *g*, 10 minutos).

- *Suero:* Se colocaron 5 ml de sangre en tubos de vidrio y se incubaron en baño termostatizado a 37°C, hasta completar el proceso de coagulación (aproximadamente 4 horas). Se procedió a la centrifugación durante 10 minutos a 1.500 *g*. Se recolectaron los sueros correspondientes.

- *Suero obtenido con gel separador:* Se colocaron 5 ml de sangre en tubos de plástico conteniendo gel acelerador (mezcla de siliconas y aceites vegetales; TAPVAL,

Argentina). La coagulación se completó en 1 hora a 37 °C. Por centrifugación, estos sistemas producen un tapón biológico que separa la muestra en tres capas: suero-gel-coágulo, evitando, principalmente, el contacto del suero con los glóbulos rojos y blancos.

Las muestras descriptas fueron fraccionadas y conservadas a - 20°C ó -70°C, según los requerimientos de las determinaciones a realizar.

- *Plasma rico en plaquetas (PRP):* Se recolectó la sangre en tubos plásticos conteniendo citrato trisódico 3,8 % en una relación de nueve partes de sangre y una parte de anticoagulante. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a baja velocidad (200 *g*) y los plasmas obtenidos se separaron con pipetas de plástico y se colocaron en tubos plásticos. Para los estudios de agregación plaquetaria, los PRP se utilizaron dentro de las dos horas de extraída la sangre.

- *Hemolizado:* Se obtuvo por lisis de glóbulos rojos: A 50 µl de sangre entera anticoagulada con K_3EDTA se agregó 1 ml de solución de ácido ascórbico (1% m/v). La mezcla se homogeneizó suavemente y se dejó actuar durante 90 minutos, a temperatura ambiente y protegida de la luz. Para la determinación de ácido fólico intraeritrocitario, los hemolizados se almacenaron a -70°C y se procesaron estrictamente, en un período ≤ 30 días.

DROGAS Y REACTIVOS QUÍMICOS

Para el desarrollo de los ensayos *in vitro* se utilizaron soluciones de: DL-homocisteína (Aldrich Chemical, EEUU), L-cisteína, DL-homocistina[§] y 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical, EE.UU.).

[§]La solución de homocistina requiere la disolución previa con un volumen mínimo de ácido HCl 0,1 N; agregado de PBS o SF y ajuste a pH = 7,2 con NaOH 0,5 N.

Según el ensayo, los reactivos se disolvieron en solución fisiológica (SF) o en *buffer* fosfato salino (*PBS*: NaCl 137 mM, KCl 3mM, Na_2HPO_4 15 mM y KH_2PO_4 1,5 mM; pH 7,2).

Además, se prepararon soluciones de fibrinógeno humano (Sigma Chemical), trombina bovina (Sigma Chemical) y concentrado de factor XIII humano (Fibrogammin P, Aventis Behring, Alemania).

El resto de los reactivos utilizados se encuentran detallados en cada experiencia y fueron del mayor grado de pureza analítica disponible.

POBLACIÓN

Dada la diversidad de grupos poblacionales evaluados, los mismos se describen en cada estudio en la sección de *Resultados*. En todos los casos se contó con el consentimiento de los participantes.

DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEINEMIA

La determinación de los niveles de Hcy en los diferentes grupos poblacionales estudiados, se realizó con una técnica de ELISA (Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay) disponible comercialmente (Axis Biochemical A.S.A., Oslo, Noruega). En el inicio de esta tesis no se disponía de resultados internacionales obtenidos por este método. Por lo tanto, se realizó la validación del ELISA, mediante estudios de precisión y de comparación con el método de referencia HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

MUESTRAS

Se utilizaron plasmas en K_3EDTA, obtenidos según las condiciones ya descriptas.

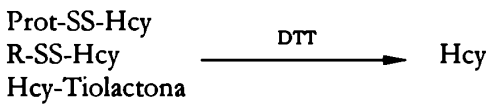
MÉTODOS

- ***ELISA***

En sangre, la homocisteína existe en varias formas: Unida a proteínas, como disulfuros Hcy-Cisteína y Hcy-Hcy, como éster cíclico tiolactona y una pequeña fracción se encuentra como Hcy libre y reducida. Si bien existen equilibrios dinámicos entre todas estas estructuras, la sumatoria de las mismas es constante y representa a la Hcy total (tHcy), cuya concentración es la que interesa conocer. Además, la Hcy reducida es la única especie que proporciona resultados reproducibles.

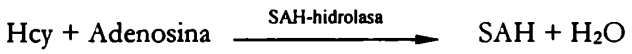
Teniendo en cuenta estas consideraciones, las muestras deben recibir un procesamiento adecuado, previo al ensayo inmunológico:

a) Reducción. Se utiliza ditiotreitol (DTT) como agente reductor para convertir la Hcy total a Hcy libre:



R = Residuo cisteína u Hcy

b) Conversión enzimática. La Hcy reducida se convierte en S-adenosil-Hcy (SAH) (especie detectable por ELISA):



A continuación se realiza el ensayo inmunológico en fase sólida, de tipo competitivo. La SAH de la muestra compite con la SAH unida al medio soporte (policubetas de poliestireno), por los sitios de unión de un anticuerpo monoclonal anti-SAH. Por el agregado de un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa y un sustrato cromogénico, se desarrolla color en función de la actividad enzimática. Las absorbancias registradas espectrofotométricamente a 450 nm, son inversamente proporcionales a las

concentraciones de Hcy total de las muestras. Con los datos obtenidos de soluciones patrones se realiza una curva de calibración (Absorbancia *vs.* log [tHcy]) y se recomienda el ajuste de la misma a una curva logística de 4 parámetros o sigmoidea dosis-respuesta de pendiente variable.

La técnica se desarrolló según las especificaciones del equipo comercial y los registros de absorbancia se realizaron con un lector de ELISA (Reader 100, Organon Teknica, Miami, EE.UU.).

- ***HPLC***

El método de referencia para el dosaje de homocisteinemia es la cromatografía líquida de alta resolución o HPLC. (High Performance Liquid Chromatography). Alícuotas de las muestras dosadas por ELISA también fueron analizadas por el método cromatográfico, con detección de fluorescencia.

Las determinaciones se realizaron según el método de D. Jacobsen *et al.*[74], con algunas modificaciones. Para el pretratamiento de las muestras se utilizó borohidruro de sodio (Fluka, Buchs, Suiza) como agente reductor y para la derivatización se usó monobromobimano (Calbiochem-Behring Diagnostics, La Jolla, EE.UU.), fluorocromóforo específico de tioles. El desarrollo cromatográfico se llevó a cabo en un equipo Hewlett Packard 1090 y con un detector de fluorescencia Shimadzu RF-530 (Shimadzu, Kyoto, Japón). Las longitudes de onda de exitación y emisión fueron de 390 nm y 480 nm respectivamente. Se utilizó una columna C18, 4 µm de 5 cm x 3,9 mm (Novapak) y como fase móvil se preparó una solución de acetonitrilo (3 %), *buffer* KH_2PO_4 (10 mM) y trietilamina (400 µM/500 ml), ajustando el pH final a 3,0 con ácido ortofosfórico. El volumen de muestra inyectado fue de 10 µl y la velocidad de flujo se reguló a 0,5 ml/min.

Todos los reactivos utilizados para el desarrollo cromatográfico fueron de calidad analítica (HPLC).

DETERMINACIONES DE OTROS ANALITOS FISIOLÓGICOS

- ***Ácido fólico sérico***

Esta vitamina se dosó en sueros, por un sistema combinado de inmunoensayo competitivo y de quimioluminiscencia (Access-Sanofi-Pasteur, Chaska, EE.UU.).

A 55 µl de la muestra se agregan caseína, un anticuerpo monoclonal anti-proteína unida a folato, ácido fólico conjugado con fosfatasa alcalina y partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-IgG. Esta mezcla de reacción se incuba 20 minutos a 37°C. El folato de la muestra compite con el ácido fólico conjugado con fosfatasa alcalina, por los sitios de unión a la caseína. Los complejos resultantes se unen a la fase sólida a través del anticuerpo monoclonal anti-proteína unida a folato. Por aplicación de un campo magnético y lavados sucesivos se descartan los compuestos no unidos a la fase sólida. Se agrega un sustrato quimioluminiscente, sobre el que actúa la fosfatasa alcalina. La luz producida es inversamente proporcional a la concentración de ácido fólico.

- ***Ácido fólico intraeritrocitario***

En los hemolizados de cada individuo se dosó la concentración de ácido fólico (AF), de manera idéntica a la determinación de ácido fólico sérico.

Con los valores del hematocrito y teniendo en cuenta la dilución (1:21) realizada en la preparación del hemolizado, se calculó el ácido fólico intraeritrocitario $AF_{Intraerit.}$ de la siguiente manera:

$$AF_{Intraerit.} = \frac{AF_{Hemolizado} \times 21}{(\text{Hematocrito}/100)}$$

- ***Vitamina B_{12}***

Se determinó en suero, por un método de quimioluminiscencia. Previamente la muestra es tratada con cianuro de potasio y ditiotreitol para convertir todas las formas en que se encuentra la cobalamina en cianocobalamina. Se agregan factor intrínseco conjugado con fosfatasa alcalina y partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpo

monoclonal anti-factor intrínseco. La vitamina B_{12} de la muestra se une al factor intrínseco conjugado compitiendo por la unión de este conjugado al anti-factor intrínseco de la fase sólida. Los compuestos no unidos se descartan por separación en un campo magnético y por sucesivos lavados. Se agrega un sustrato quimioluminiscente sobre el que actúa la fosfatasa alcalina. La luz generada es inversamente proporcional a la concentración de vitamina B_{12}.

- ***Dermatán sulfato***

Los niveles de DS en plasma se dosaron por un método amidolítico indirecto en dos etapas (Stachrom DS, Diagnostica Stago). En la primera etapa el plasma se adsorbe con una suspensión de bentonita para eliminar el cofactor II de la heparina (HCII), la antitrombina III y el fibrinógeno. El sobrenadante se incuba con HCII purificado y exceso de trombina. La trombina residual se determina por su actividad amidolítica sobre el sustrato cromogénico CBS 61.50. La liberación de *p*-nitroanilina se registra espectro-fotométricamente a 405 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de DS. Se procedió según las especificaciones del equipo comercial.

Para el desarrollo de esta tesis también fueron requeridos datos de determinaciones habituales en el laboratorio clínico, tales como: ***Hemograma*** (equipo automatizado Cell Dyn 3500, Abbott, EE.UU.); ***Colesterol total*** (método colorimétrico, Sera PAK Plus, Bayer, Alemania.); ***HDL-Colesterol*** (método colorimétrico de punto final, precipitante: ácido fosfotúngstico, Wiener Lab, Argentina); ***Triglicéridos*** (método colorimétrico, Sera PAK Plus, Bayer); ***Creatinina*** (método cinético de Jaffe, sin desproteinizar, Bio-System, España); ***Ferritina*** (quimioluminiscencia, Immulite, EE.UU.).

PRUEBAS DE EVALUACIÓN DEL SISTEMA HEMOSTÁTICO

PLAQUETAS

- ***Estudios de agregación plaquetaria***

Esta técnica evalúa la funcionalidad de las plaquetas. La agregación plaquetaria es la interacción plaqueta-plaqueta, que requiere la integridad metabólica de las mismas. La prueba se basa en inducir la agregación *in vitro,* por la adición de un agonista o inductor.

La respuesta plaquetaria se midió por el método turbidimétrico[141], que mide los cambios de transmitancia de la luz como resultado de la formación de agregados. A medida que las plaquetas se agregan y permiten el mayor pasaje de luz, disminuyendo la DO, se grafican las curvas de agregación en función del tiempo. La temperatura del ensayo debe mantenerse en 37°C, con agitación constante y en presencia de fibrinógeno.

Se utilizó plasma rico en plaquetas (PRP), obtenido a partir de sangre de voluntarios con 8 hs. de ayuno y que no hubiesen tomado aspirina en los 12 días previos a la extracción. Las pruebas se realizaron con un agregómetro Dual Aggro-Meter (Chrono-Log, EE.UU). Los inductores utilizados fueron:

- Trombina bovina (Abbot, EE.UU.). Concentración final = 0,2 - 0,5 UI/ml (en solución fisiológica).
- ADP (Adenosín difosfato, Sigma Chemical): Concentración final = 3,3 x 10^{-6} M (en solución fisiológica).
- Colágeno (de tendón; Meditech, EE.UU.): Concentración final = 1 – 2 μg/ml (en agua).

SISTEMA DE COAGULACIÓN

Se utilizaron plasmas obtenidos en citrato de sodio 3,8 %. Todas las pruebas de coagulación se realizaron con un coagulómetro semiautomático ST4 (Diagnostica Stago, Francia). En todos los casos se utilizó como plasma de referencia un *pool* de plasmas normales comercial (Unicalibrator, Diagnostica Stago, Francia).

- ***Tiempo de protombina (TP) o Método de Quick*** [142]

La técnica consiste en determinar el tiempo de coagulación del plasma en presencia de un exceso de tromboplastina (factor tisular) e iones Ca^{2+}. El TP involucra a los factores de la vía extrínseca del sistema de coagulación: VII, X, V, II y I.

Se preparan diluciones a partir del plasma de referencia y se realiza una curva de calibración: Tiempo de Coagulación *versus* % Protrombina. El tiempo de coagulación de la muestra se interpola en la curva y se obtiene el porcentaje de protrombina correspondiente.

En particular, en este estudio se utilizó tromboplastina cálcica comercial (Neoplastine, Diagnostica Stago). La técnica se realizó según las instrucciones del fabricante para su utilización en un coagulómetro semiautomático.

- ***Relación Internacional Normalizada (RIN)***

El control de la terapia con anticoagulantes orales (compuestos dicumarínicos o warfarina) se realiza con el Tiempo de Protrombina. Dada la diversidad de tromboplastinas existentes y la variación en los métodos de dosaje del TP, se ha propuesto estandarizar la expresión de los resultados del TP. Por lo tanto, para el monitoreo de la anticoagulación oral se recomienda el uso de RIN[143]:

$$RIN = R^{ISI} \qquad R = \frac{TP_{\text{Muestra}}}{TP_{\text{Plasma normal}}}$$

ISI (Índice de Sensibilidad Internacional): Este índice lo provee el fabricante de la trombo-plastina e indica la sensibilidad de esta última respecto a una tromboplastina patrón proporcionada por la Organización Mundial de la Salud.

- ***Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)***

Es una prueba global para estudiar la vía intrínseca de la coagulación. Se basa en medir el tiempo de coagulación de un plasma con el agregado de una cantidad estándar de cefalina (fosfolípidos), un activador del sistema de contacto e iones Ca^{2+} [144].

Se utilizó el reactivo comercial C.K. Prest (Diagnostica Stago), que contiene cefalina y caolín como activador. Se procedió según el protocolo del equipo y con el agregado de una solución de $CaCl_2$ 0,025 M se registraron los tiempos de coagulación correspondientes al plasma de referencia y a las muestras.

- ***Tiempo de trombina (TT)***

Esta técnica evalúa el proceso de fibrinoformación. Se mide el tiempo de coagulación del plasma en presencia de una cantidad determinada de trombina[145].

Se utilizó el reactivo comercial Thrombin Prest (Diagnostica Stago), con una concentración de trombina de 1,5 unidades NIH/ml. Se procedió según las indicaciones del equipo y se determinaron los tiempos de coagulación del plasma de referencia y de cada muestra.

- ***Fibrinógeno***

El dosaje se realizó con el método funcional de Clauss[146], en el que el tiempo de coagulación con trombina de plasma diluido es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno del plasma. Con un plasma patrón equivalente a un *pool* de plasmas normales (Unicalibrator, Diagnostica Stago), se realiza una curva de calibración con diluciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80. Se procedió según las indicaciones del equipo comercial utilizado (Fibri-Prest, Diagnostica Stago). Los resultados se expresaron en mg/dl.

- ***Factores II, V, VII y X***

En todos los casos se realizó el método en una etapa. Mediante esta técnica se determina funcionalmente el porcentaje de actividad del factor presente en la muestra en estudio respecto a un plasma de referencia o *pool* de plasmas normales. El plasma a estudiar se diluye 1:10 con solución fisiológica o con un *buffer* apropiado, considerando a esta dilución como el 100% de actividad del factor. Se mezcla un volumen del plasma diluido con un volumen de plasma deficitario del factor en estudio y se mide el tiempo de coagulación en presencia de tromboplastina e iones Ca^{2+}.

Para la determinación de cada factor se utilizó tromboplastina cálcica (Neoplastine) y plasmas deficitarios comerciales (Diagnostica Stago).

Con el plasma de referencia se realizaron diluciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 y se graficó una curva de calibración: Tiempo de Coagulación *versus* Concentración del Factor. Interpolando el tiempo de coagulación de la muestra se obtuvo el % de actividad respecto al plasma normal.

- ***Factores VIII, IX, XI y XII***

Todas las determinaciones se realizaron mediante la técnica en una etapa. El plasma a estudiar se diluye 1:10 con solución fisiológica o con un *buffer* apropiado, considerando a esta dilución como el 100% de actividad del factor. Se mezcla un volumen del plasma diluido con un volumen de plasma deficitario del factor en estudio y se mide el tiempo de coagulación en presencia de cefalina, de un activador e iones Ca^{2+}.

Se utilizaron plasmas deficitarios comerciales (Diagnostica Stago) y el reactivo C.K. Prest, que contiene cefalina y caolín como activador. Se procedió según el protocolo del equipo y con el agregado de una solución de $CaCl_2$ 0,025 M se registraron los tiempos de coagulación.

Con el plasma de referencia se realizaron diluciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 y se graficó una curva de calibración: Tiempo de Coagulación *versus* Concentración del Factor. Interpolando el tiempo de coagulación de la muestra se obtuvo el % de actividad respecto al plasma normal.

- ***Factor XIII***

La actividad del factor XIII se determinó por dos métodos:

a) Espectrofotométrico [147]: El FXIII contenido en la muestra es activado a FXIIIa por trombina. En la reacción también se produce fibrina, la que se mantiene en solución por el agregado de un péptido inhibidor de la agregación. El FXIIIa acopla un sustrato peptídico específico al éster glicinoetílico, liberando amoníaco. Este último se determina simultáneamente en una reacción enzimática en la que intervienen NH_3, NADH y α-cetoglutarato. Se mide el consumo de NADH (proporcional a la actividad del factor XIII), registrando el descenso de absorbancia a 340 nm.

Esta determinación se realizó con un coagulómetro automático BCT (Dade-Behring M.G., Alemania) y se utilizaron los reactivos Berichrom FXIII (Dade-Behring), siguiendo las indicaciones del equipo.

b) Prueba de solubilidad en urea [148]: Esta prueba permite evaluar la actividad del FXIII en función de la solubilidad de la red de fibrina en una solución de urea 5 M. El tiempo de disolución es directamente proporcional a la concentración de FXIII presente en el plasma.

En tubos de vidrio se agregaron 200 µl de cada muestra, 100 µl de $CaCl_2$ (0,025 M) y 100 µl de trombina bovina 1,5 NIH (Sigma Chemical). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se obtuvieron los coágulos correspondientes, los que fueron despegados del vidrio cuidadosamente. A cada tubo se agregaron 3 ml de solución de urea 5 M. Periódicamente los sistemas se mezclaron por inversión y se registraron la consistencia de los coágulos a las 24, 30, 40, 50 y 65 horas.

- ***Factor von Willebrand***

Se determinó por electro-inmunodifusión (Assera-Plate vWF, Diagnostica Stago, Francia). Bajo la aplicación de un campo eléctrico, el factor von Willebrand (FvW)

contenido en la muestra migra sobre un gel de agarosa que contiene anticuerpos específicos anti-FvW. Durante la migración electroforética el FvW precipita cuando el complejo antígeno-anticuerpo alcanza la relación óptima. La altura del pico de precipitación (o *rocket*) es directamente proporcional a la concentración de FvW de la muestra. Simultáneamente se realiza la experiencia con una curva de calibración.

La corrida electroforética se desarrolló durante 24 hs, a 75 mA de intensidad de corriente. Se procedió según las especificaciones del equipo comercial.

FIBRINOLISIS

- ***Tiempo de lisis de sangre entera diluida***

La técnica consiste en diluir la sangre en *buffer* fosfato y luego determinar el tiempo de lisis del coágulo, formado por el agregado de trombina. La dilución de la sangre entera, en la cual se mantiene la proporción normal de los componentes del sistema fibrinolítico, facilita la acción de los activadores fibrinolíticos y acorta el tiempo de lisis de los coágulos.

La prueba se realizó dentro de los 20 minutos de la obtención de la muestra. En tubos de vidrio se agregaron 1,7 ml de *buffer* fosfato (Na_2HPO_4 9,47 g; KH_2PO_4 3,02 g; H_2O destilada c.s.p. 1250 ml; pH 7,4); 0,1 ml de solución de trombina 50 UI/ml y 0,2 ml de sangre entera extraída en citrato de sodio 3,8 %. Inmediatamente se mezcló por inversión y los tubos se dejaron 30 minutos a 4°C. Se verificó que la coagulación fuese completa en todos los tubos, los que se llevaron a 37°C (tiempo cero). Periódicamente se investigó la lisis del coágulo formado. Se registró el momento de su lisis completa y se asignó como tiempo de lisis de sangre entera diluida.

- ***Tiempo de lisis de euglobulinas***

La técnica consiste en precipitar en medio ácido la fracción de euglobulinas del plasma (contiene principalmente plasminógeno, fibrinógeno y los activadores del

plasminógeno) y luego redisolverla en medio alcalino, registrando el tiempo de lisis del coágulo, formado por agregado de cloruro de calcio o trombina.

La prueba se realizó dentro de los 20 minutos de la obtención de la muestra. En tubos cónicos de vidrio se agregaron 0,5 ml de muestra, 9 ml de agua destilada y 0,1 ml de ácido acético 1%. Se dejaron 30 minutos a 4 °C para que se complete la precipitación de las euglobulinas. Luego se procedió a la centrifugación a 3.000 *g*, durante 5 minutos. Se descartaron los sobrenadantes. A cada tubo se agregaron 0,5 ml de *buffer* borato (NaCl 0,15 M, borato de sodio 2,6 μM, pH 9) para la disolución del precipitado (a 37 °C). Por el agregado de 0,5 ml de $CaCl_2$ 0,025 M, se obtuvieron los coágulos correspondientes (tiempo cero). Los tubos se mantuvieron a 37 °C y se registró el momento de la lisis completa (*tiempo de lisis de euglobulinas*) en cada uno.

FORMACIÓN DE REDES DE FIBRINA

Se evaluó el efecto de la homocisteína en la fibrinoformación y se comparó con la acción de otros compuestos azufrados.

MUESTRAS

Alícuotas de un *pool* de plasmas normales citratados se incubaron separadamente (a 37 °C, 1 hora) con soluciones de homocisteína, cisteína y homocistina con una concentración final (c.f.) = 0,3 mM. La muestra control se obtuvo reemplazando los compuestos azufrados por *buffer* PBS (NaCl 137 mM, KCl 3mM, Na_2HPO_4 15 mM y KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,2).

Se utilizaron soluciones frescas de homocisteína, cisteína y homocistina, en PBS.

FIBRINOFORMACIÓN

A cada una de las muestras plasmáticas modificadas se agregó trombina bovina (c.f.= 0,05 U/ml) y $CaCl_2$ (c.f.= 33 mM), obteniéndose los coágulos correspondientes. Los ensayos se realizaron por triplicado, en policubetas de poliestireno.

La fibrinoformación y las redes de fibrina fueron evaluadas mediante estudios cinéticos y por microscopía electrónica, respectivamente.

- ***Estudios cinéticos.***

Durante el proceso de coagulación de cada uno de los plasmas ensayados, se registró la densidad óptica (DO) a 450 nm, cada 2 minutos hasta valor constante[149] (Reader 100, Organon Teknica, EE.UU.).

- ***Microscopía electrónica.***

Los geles plasmáticos finales se dejaron estabilizar 18 horas a 4 °C. Los pasos subsiguientes se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras se fijaron con glutaraldehído (30%)- paraformaldehído (2,5%) durante 2 horas y luego con tetróxido de osmio (1%). Luego fueron deshidratadas con soluciones de acetona en agua en concentraciones crecientes (50, 70, 85 y 100 %). Todos los reactivos utilizados fueron provistos por Sigma Chemical. Las muestras se secaron por punto crítico (Baltec CPD 030, Balzers, Alemania) y fueron metalizadas para su observación en un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss DMS 940 A, Oberkochen, Alemania)[150]. Las observaciones se realizaron a 5 kvolts y se obtuvieron las fotografías correspondientes a 3.000 aumentos.

Para realizar mediciones sobre las fotos se utilizó un sistema analizador de imágenes (Q520 Leica, Cambridge, Inglaterra). Se evaluaron 12 campos de igual área, aleatoriamente seleccionados y se caracterizó cada red determinando el número de fibras por campo, el porcentaje de red, el ancho y largo de las fibras.

PERFILES ELECTROFORÉTICOS

Se analizaron los perfiles electroforéticos de muestras (soluciones de fibrinógeno y factor XIII) incubadas *in vitro* con homocisteína. Las proporciones y condiciones se detallan en la sección de *Resultados*.

- ***Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)***

Se realizaron las corridas electroforéticas según el método descripto por Laemmli[151]. Se prepararon mini-geles de poliacrilamida de 4 % (gel concentrador) y 7,5 % (gel separador). Las muestras se diluyeron en *buffer* Tris-HCl pH 6,8 y SDS (4%)-glicerol (1 gota), a una concentración de 0,6 mg proteínas/ml. Luego de un calentamiento a 100°C durante 2 minutos, se sembraron 10 µl de cada una de ellas. Una de las muestras recibió tratamiento reductor con 2-mercaptoetanol (10 %). El *buffer* para el desarrollo electro-forético fue Tris-glicina-SDS, pH 8,3.

Las corridas electroforéticas se realizaron a 25 mA, con un voltaje máximo de 140 volts, durante 1 hora (Equipo Pharmacia Biotech EPS 600, Suecia). Los geles se tiñeron con solución 0,1 % de Azul Brillante de Coomasie (Sigma Chemical) durante 30 minutos y se decoloraron con solución 7 % de ácido acético. Los geles se deshidrataron al aire, en papel celofán.

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO C677T DE LA *MTHFR*

El estudio de la sustitución C677T en la MTHFR se llevó a cabo por amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) del fragmento 198-pb ADN y digestión posterior del mismo con la enzima de restricción Hinf I, según la técnica descripta por Frosst y colaboradores[22].

MUESTRAS

Sangre entera anticoagulada con K_3EDTA (7,5 %). Las muestras fueron congeladas a –70 °C hasta el momento de su procesamiento.

MÉTODO

El estudio de la sustitución se realizó en tres etapas.

1. Extracción de ADN con proteinasa K

Se trataron 0,5 ml de sangre con *buffer* TE hasta obtener un *pellet* claro. Luego de centrifugar a 14.000 g (centrífuga Hermle Z 200 M/H, Alemania) durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 270 µl de *buffer* de incubación y 30 µl de proteinasa K (Sigma Chemical). Las muestras se incubaron toda la noche a 56°C. Posteriormente se inactivó la proteinasa K a 100°C durante 10 minutos.

Verificación de la extracción: Se realizó por electroforesis en gel de agarosa (Promega, EE.UU.) 1 % en *buffer* TBE, conteniendo de bromuro de etidio. Se sembraron 3 µl de la muestra de ADN, coloreado con azul de bromofenol. La corrida electroforética se realizó a 100 volts durante 60 minutos. La calidad de la banda se observó con un transiluminador Hoefer Macro Vue UV-20 (UV Transilluminator, California, EE.UU).

Soluciones utilizadas:

-Proteinasa K: 1 mg/ml en buffer Tris 50 mM, acetato de calcio 3 mM, pH 8.

-Buffer TE de lavado: Tris 1,21 g/l, EDTA 0,37 g/l, pH 8.

-Buffer incubación: KCl 50 mM, Tris 10 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, Tween 20 0,5 % v/v, pH 9.

2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction)

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar una secuencia específica de ADN, con alta especificidad y sensibilidad. Esencialmente la PCR consiste en someter una mezcla de reacción a una secuencia de ciclos térmicos, para permitir la síntesis de una secuencia de ADN específica.

La mezcla de reacción contiene el ADN de partida, dos oligonucleótidos que señalarán los puntos de inicio de la síntesis (*primers*) (Biodynamics, Argentina), la enzima ADN polimerasa termoestable (Promega, EE.UU.), iones Mg^{2+} y una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato precursores (dNTPs: A, G, C, T) (Promega).

Los tubos conteniendo 50 µl de la mezcla de reacción se sometieron a ciclos térmicos en un equipo Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania). El proceso completo para cada muestra fue de 2 horas, según el siguiente programa:

Temperatura	*Tiempo*		*Proceso*
94 °C	3 minutos		Inicio
94 °C	45 segundos	30 ciclos	Desnaturalización del ADN
56 °C	1 minuto		Unión de los *primers*
72 °C	45 segundos		Síntesis de fragmentos de ADN
4 °C			Final

Además de las muestras se procesaron un control de diagnóstico y un control negativo.

Verificación de la PCR: Se realizó por electroforesis en gel de agarosa (Promega, EE.UU.) 1% en *buffer* TBE, conteniendo 5 µl de bromuro de etidio. Se sembraron 20 µl del producto de PCR del control negativo y 5 µl del producto de PCR de cada muestra, coloreados con xilene. La corrida electroforética se realizó a 100 volts durante 30 minutos. Las bandas se observaron con el transiluminador. Si el proceso de PCR se realizó correctamente debe verificarse ausencia de producto de amplificación en la siembra del control negativo y una sola banda en el caso de las muestras. De lo contrario, se sospecha una contaminación o amplificación inadecuada.

Soluciones utilizadas:

-Buffer TBE: Tris 10,8 g/l, Ac.bórico 5,5 g/l, EDTA (0,5 mM pH 8) 4 ml/l

-Bromuro de etidio: 5µl (10mg/ml de bromuro de etidio en buffer TBE) en 100 ml gel

-Colorante: Xilene 0,1 % p/v, glicerol 40 % v/v, *buffer* TBE 60% v/v

3. Estudio del producto de amplificación

En esta etapa el producto de amplificación se incuba con una enzima de restricción específica que produce un corte en el fragmento amplificado si el mismo presenta la sustitución C677T.

Se incubaron 10 µl de los productos de PCR con 15 µl de la enzima Hinf I (10.000U/ml) (New England Biolabs, EE.UU.), a 37 °C durante toda la noche.

El diagnóstico final se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 2,5% en *buffer* TBE con bromuro de etidio. Se sembraron 25 µl de la mezcla de incubación coloreada con xilene. La corrida se realizó a 100 volts durante 3 horas. Las bandas se observaron con el transiluminador.

La sustitución C677T genera un sitio de corte para HinfI. El fragmento de 198 pb es entonces cortado en dos fragmentos de 175 y 23 pb. El genotipo de cada individuo se establece según el patrón de bandas obtenido (Figura 5).

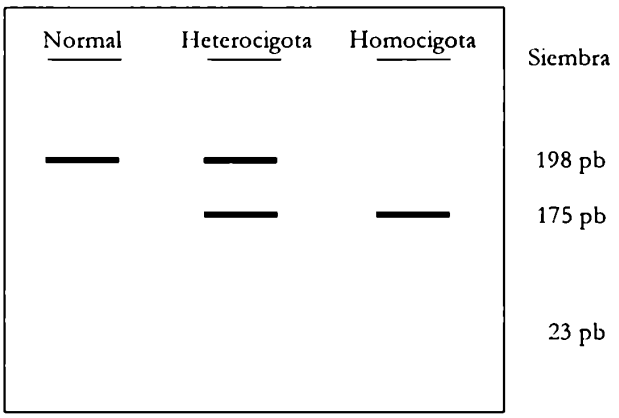


Figura 5. Esquema del perfil electroforético de los tres genotipos posibles para la variante termolábil de la MTHFR. Los fragmentos de 23 pb no suelen observarse en el gel.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico y presentación de los datos se utilizaron los programas Statistix V 2.1 y GraphPad Prism V 2.0. A continuación se enumeran los parámetros y pruebas realizadas[152,153].

- ***Análisis de datos cuantitativos***

Para evaluar la distribución de las variables analizadas se realizaron histogramas y gráficos de tipo *Box & Whisker plots*. Se probó normalidad con el *test* de Shapiro-Wilk.

Se calcularon medidas de posición y dispersión. Los resultados fueron expresados como media ± DE (distribuciones simétricas) o mediana y rango (distribuciones asimétricas).

Medidas de posición

- *Media:* Promedio aritmético de las observaciones. Es una medida muy sensible a la presencia de datos anómalos (*outliers*).
- *Mediana:* Dato central, divide a la muestra ordenada en dos partes de igual tamaño. Es una medida resistente a la presencia de datos atípicos.

Medidas de dispersión

- *Desvío estándar (DE)*: Dispersión de los datos alrededor de su media.
- *Rango*: Diferencia entre el dato mayor y el menor. También se expresó mostrando el valor máximo y el mínimo de los datos.
- *Coeficiente de variación (C.V.)*: Desvío estándar dividido la media, por 100 (%). Es el modo de expresión del DE como porcentaje de la media.
- *Percentiles (α %)*: dato de la muestra ordenada que deja α % de valores debajo de sí mismo. Los percentiles 2,5 % y 97,5 % se utilizaron para determinar los límites del rango de homocisteinemia. Cuando los datos mostraron una distribución normal,

esos límites coinciden con los valores de la media ± 1,96 DE, conteniendo el 95 % central de los resultados.

Comparación de poblaciones

Según las características de los datos a evaluar se utilizaron pruebas parámetricas y no paramétricas: *test* de Student, *test* de z, *test* del signo y *test* de Mann-Whitney-Wilcoxon. En todos los casos se consideró significación estadística cuando el valor de *p* resultó menor a 0,05.

Pruebas de asociación

Para evaluar la relación entre dos variables numéricas se utilizaron diagramas de dispersión (*Scatter Plot*). Se realizaron análisis de regresión lineal y para describir el grado de asociación entre las variables se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (cuando los datos presentaron distribución normal) o de Spearman (cuando los datos no presentaron distribución normal).

Comparación de métodos analíticos

Para comparar las técnicas de determinación de homocisteína (ELISA *vs.* HPLC) y establecer la equivalencia entre ambos métodos se realizó la prueba de Bland-Altman[154].

- ***Análisis de datos categóricos***

Para evaluar la relación o asociación entre dos variables categóricas en los estudios retrospectivos se calcularon los *Odds ratios* y sus intervalos de confianza (IC 95 %).

Para comparar proporciones se utilizó la prueba de chi cuadrado con la corrección de Yates.

RESULTADOS

NIVELES PLASMÁTICOS DE HOMOCISTEÍNA

Para llevar a cabo la determinación de homocisteinemia en diferentes grupos poblacionales fue prioritario elegir un método confiable y accesible. Con este fin se optó por una técnica de ELISA (Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay), disponible comercialmente. Si bien se trata de una metodología rápida y de equipamiento simple, en el comienzo de nuestros estudios en el tema no se contaba con reportes internacionales que avalaran los resultados de esta técnica. Por lo tanto, el primer objetivo fue realizar la validación y estandarización del ELISA para la medición de Hcy.

Con el fin de optimizar los resultados de homocisteinemia se evaluaron condiciones inherentes a las muestras: tipo de muestras sanguíneas, estabilidad ante congelamientos y descongelamientos sucesivos y efectos de la variabilidad biológica.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA

La validación de la técnica de ELISA para la determinación de los niveles de Hcy, se llevó a cabo mediante estudios de precisión y de comparación con el método de referencia (HPLC: High Performance Liquid Chromatography).

Se obtuvieron plasmas en K_3EDTA de 97 individuos con 8 horas de ayuno. Las muestras se alicuotaron y congelaron inmediatamente a -70 °C hasta el momento de su procesamiento. Se determinó la concentración de Hcy en cada una de las muestras.

- ***Precisión***

Se determinaron los coeficientes de variación del intra e inter-ensayo. Para el intra-ensayo se analizaron tres muestras (de baja, media y alta concentración de Hcy). Cada uno de los plasmas fueron dosados 12 veces en el mismo análisis.

La precisión del inter-ensayo se determinó estudiando las mismas muestras, por duplicado, 12 días diferentes durante 6 semanas. En todos los casos se determinaron los coeficientes de variación (C.V.). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes de variación (C.V.) del método de ELISA.

[Hcy] *µM*	*C.V. Intra-ensayo* *%*	*C.V. Inter-ensayo* *%*
4,0 – 10,0	7,9	8,5
11,0 – 20,0	6,8	7,0
> 20,0	8,4	8,2

[Hcy]: concentración de Hcy plasmática total.

- ***Comparación de métodos***

Se realizó la comparación del método de ELISA *versus* HPLC. Entre los 97 plasmas analizados por la técnica de ELISA (rango de Hcy = 4,0 – 54,0 µM), se seleccionaron 50 muestras (de niveles bajos, medios y altos de Hcy): 18 muestras entre 4-

10 μM; 20 muestras entre 11-20 μM y 12 muestras > 20 μM. Además, estos plasmas fueron analizados por HPLC (rango de Hcy = 4,8 – 52,0 μM).

Los datos obtenidos por ambos métodos, para las mismas 50 muestras, fueron comparados por: (a) Análisis de regresión lineal y (b) Prueba de Bland-Altman[154].

(a) La Figura 6 muestra la curva de la regresión lineal entre los datos obtenidos por ELISA *vs.* HPLC. Este análisis estadístico dio como resultado:

y = 0,952 x + 1,242; coeficiente de correlación, r = 0,984; r^2 = 0,968 y error estándar de la estimación, $S_{y/x}$ = 1,483.

(b) La Figura 7 representa la distribución de los puntos obtenidos cuando se grafica la diferencia entre las determinaciones de Hcy para cada muestra por ELISA y HPLC *versus* el promedio de los resultados obtenidos con las mismas muestras, por las dos técnicas. J. Bland y D. Altman proponen este análisis como método alternativo y de mayor información para comparar valores obtenidos por un método nuevo respecto de otro ya establecido. En el caso en que las dos técnicas no difieran significativamente, el método tradicional puede reemplazarse por el nuevo.

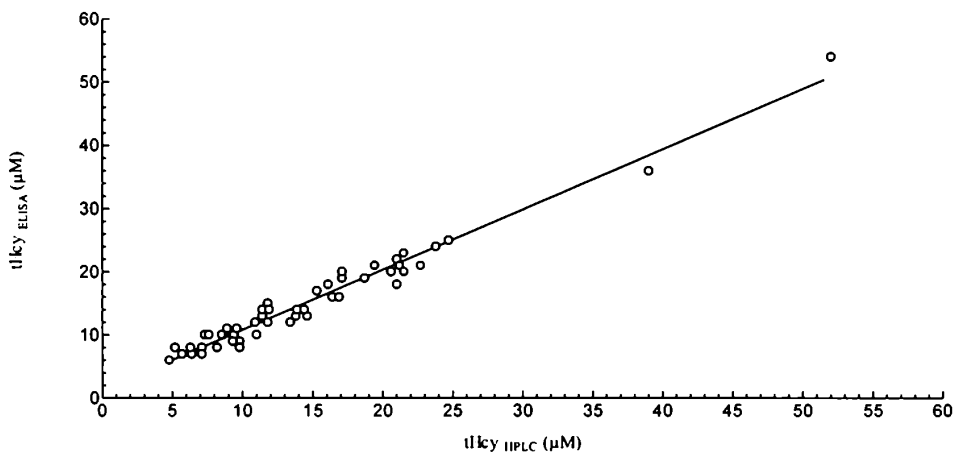


Figura 6. Curva de regresión lineal entre los resultados de Hcy determinados por ELISA y HPLC.

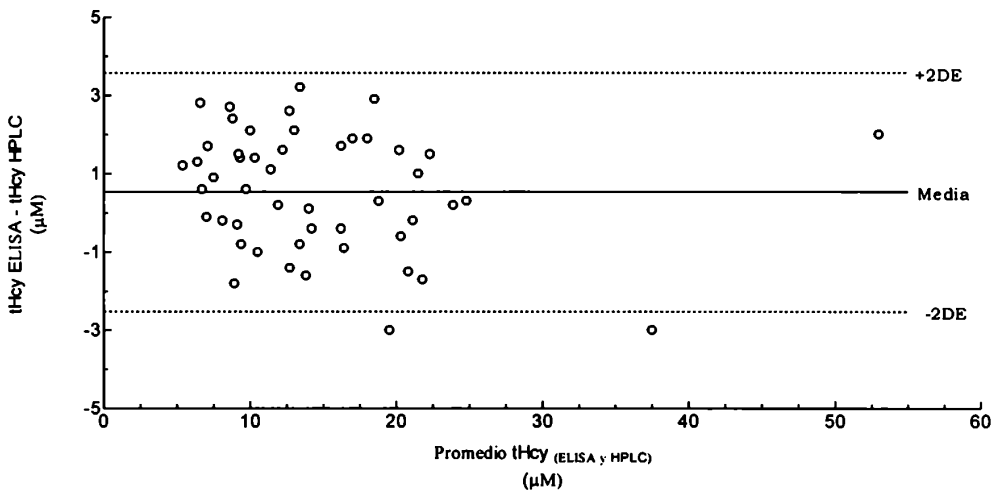


Figura 7. Prueba de Bland-Altman. DE: Desvío estándar.

Para las 50 muestras utilizadas en la comparación de los dos métodos se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla 5.

Tabla 5. Diferencia y promedio de los resultados obtenidos por ELISA y HPLC.

	$Hcy_{ELISA} - Hcy_{HPLC}$	$(Hcy_{ELISA} \cdot Hcy_{HPLC}) / 2$
Promedio	0,5	15,0
Desvío estándar	1,5	8,4
Mínimo	- 3,0	5,4
Máximo	3,2	53,0

n = 50; Hcy: Concentración de homocisteína plasmática total expresada en µM.

DISCUSIÓN

La técnica de ELISA (Axis®) para la cuantificación de los niveles de homocisteinemia utiliza un volumen muy pequeño de muestra (25 µl), permite procesar por duplicado 39 muestras, tres controles y la curva de calibración en 4 horas y requiere un equipamiento simple. Estas características resultaron importantes para realizar las determinaciones en esta tesis.

Los resultados muestran que para un amplio rango de concentraciones (4,0 – 54,0 µM) los coeficientes de variación del intra-ensayo y del inter-ensayo son ≤ 8.5 %, lo que permite obtener datos reproducibles y confiables.

La comparación entre el ELISA y el método de referencia (HPLC) demostró que los resultados registrados por ambos métodos son equivalentes. El análisis de la regresión lineal muestra un alto coeficiente de correlación (r = 0,984) y un valor de la *pendiente* cercano a 1 (0,952). Si bien la *ordenada al origen* de la regresión dio un valor distinto de cero, este dato no resultó estadísticamente significativo (p = 0,50).

Por otra parte, la prueba de Bland-Altman muestra que el promedio de la diferencia de los resultados entre los dos métodos es 0,5 µM, sugiriendo una buena correspondencia.

En la Figura 7 no se observa sesgo entre los datos obtenidos por ELISA respecto a los de HPLC. Además, dos veces el desvío estándar de esa diferencia (DE = 1,5) indica que los datos obtenidos por ambos métodos podrían diferir, como máximo, en 3 µM con 95 % de confianza.

J. Pietzch *et al.* [155] realizaron la comparación entre el ELISA (Axis®) y la cromatografía gaseosa/espectrometría de masa (CG/EM). Este grupo determinó la concentración de Hcy in 104 muestras plasmáticas por ambos métodos (rango de Hcy = 1,60 - 82,34 µM). Los coeficientes de variación del ELISA para el intra- e inter-ensayo fueron < 6,2 % y < 8,0 %, respectivamente. Además, el ELISA mostró concordancia con CG/EM (r = 0,993; *pendiente* = 1,056; *ordenada* = -0,133 µM y $S_{y \cdot x}$ = 0,768).

Por otra parte, el método de ELISA (no comercial) desarrollado por Frantzen *et al.*, mostró buena correlación con HPLC[77]. El análisis de la regresión lineal de los datos presentó la siguiente ecuación: $y = 0{,}933\ x + 0{,}184$ ($n = 44$; $r = 0{,}986$; $S_{y/x} = 2{,}357$). También con este método se obtuvo buena precisión (C.V. < 6-8 %).

Los resultados de estos trabajos internacionales avalan nuestras conclusiones, si bien los sistemas analizados no son completamente coincidentes.

Por lo tanto, la técnica de ELISA para la determinación de homocisteína plasmática provee datos equivalentes a los de HPLC, reproducibles y confiables.

CONDICIONES DE LAS MUESTRAS

Con el fin de optimizar algunos aspectos de la fase pre-analítica, se evaluaron los niveles de homocisteína en muestras obtenidas en distintas condiciones.

- ***Plasmas/Sueros***

Se extrajo sangre venosa a 20 individuos en ayunas, obteniendo 4 muestras de cada uno:

Muestra A: Plasma en K3EDTA (2,5 ml de sangre con 61 µl de una solución de K3EDTA 7,5 %).

Muestra B: Plasma en citrato trisódico (9 partes de sangre y 1 parte de solución de citrato trisódico 3,8 %).

Muestra C: Suero obtenido según el procedimiento convencional.

Muestra D: Suero obtenido con gel separador.

Los procedimientos para la obtención de plasmas y sueros se describen en la sección de Materiales y Métodos. En todos los casos las muestras fueron alicuotadas y conservadas a – 70 °C, hasta el momento de ser utilizadas.

Para evitar los errores inter-ensayo se determinaron los niveles de Hcy en cada una de las muestras, con un mismo equipo de ELISA.

Teniendo en cuenta que el volumen de anticoagulante utilizado ejerce un efecto de dilución (principalmente en el caso del citrato trisódico), deben corregirse las concentraciones de Hcy, por el factor correspondiente. Debido a que las soluciones anticoagulantes permanecen en la fase extracelular, debe considerarse sólo el volumen de plasma centrifugado y no el volumen de sangre entera.

Por lo tanto:

$$[Hcy]_{Corregida} = F \times [Hcy]_{Determinada}$$

$$F = \frac{(Vol_{Plasma} + Vol_{Anticoagulante})}{Vol_{Plasma}} \qquad Vol_{Plasma} = Vol_{Sangre}\,(1 - Hto)$$

[Hcy]: Concentración de Hcy total

Vol: Volumen

Hto: Hematocrito

Asumiendo que el hematocrito promedio es 0,42 l/l y 0,46 l/l para mujeres y hombres respectivamente, resultan los siguientes factores de corrección:

- *Muestras de sangre extraídas en K_3EDTA*

  $F_{Mujeres} = 1{,}042$ $\qquad$ $F_{Hombres} = 1{,}045$

- *Muestras de sangre extraídas en citrato trisódico*

  $F_{Mujeres} = 1{,}192$ $\qquad$ $F_{Hombres} = 1{,}206$

Los valores de Hcy de todas las muestras plasmáticas (A y B) fueron corregidos por el factor de dilución correspondiente. En la Tabla 6 se resumen los valores de Hcy para todas las muestras.

Tabla 6. Niveles de homocisteína en plasmas y sueros.

	Hcy (μM)	*$Hcy_{corregida}$(μM)*
Muestras A (n = 20)	11,5 (7,0 – 47,2)	12,0 (7,3 – 49,2)
Muestras B (n = 20)	8,3 (4,8 – 35,5)	9,9 (5,7 – 42,3)
Muestras C (n = 20)	14,2 (8,9 – 54,5)	_____
Muestras D (n = 20)	11,8 (7,2 – 48,1)	_____

Los datos están expresados como mediana y rango.

Se calcularon las diferencias entre los valores de Hcy determinados en los distintos tipos de muestras, para cada individuo. Para este análisis, las muestras de referencia fueron los plasmas en K_3EDTA (Tabla 7). En la evaluación de los datos obtenidos con las *Muestras A* y *B*, se utilizaron los valores corregidos por el factor de dilución correspondiente.

Tabla 7. Diferencias de la Hcy en las muestras B, C y D respecto a la muestra A.

	Δ *(μM)*	Δ *(%)*	*p*
Muestras A vs. B	1,9 [0,8 – 7,1]	15,4 [7,2 – 27,6]	0,0001
Muestras A vs. C	-2,5 [(-5,3) – (-0,8)]	-14,4 [(-24,3) – (-6,9)]	0,0001
Muestras A vs. D	0,5 [(-1,9) – 2,3)]	3,3 [(-7,7) – (16,6)]	NS

Δ: Diferencia entre los datos de Hcy de cada tipo de muestra para cada individuo. Los resultados están expresados como mediana y rango. El análisis estadístico se realizó con el *test* de Wilcoxon para muestras apareadas.

- ***Congelamientos/Descongelamientos sucesivos***

Alícuotas de las 20 muestras plasmáticas en K_3EDTA obtenidas para la sección anterior se sometieron a cuatro congelamientos (a -70°C) y descongelamientos cada 45 días, en un período de seis meses (*Procesos 1, 2, 3* y *4*). En cada proceso, las muestras descongeladas se dejaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Luego de cada procedimiento, se determinaron los niveles de Hcy. Debido a que el factor de dilución para las muestras en K_3EDTA es prácticamente 1 y que, además, en cada proceso se dosaron las mismas muestras, los datos obtenidos no fueron corregidos por el efecto de la dilución (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del congelamiento en los niveles de Hcy.

	n	*Hcy (µM)*
Muestras Proceso 1	20	11,5 (7,0 – 47,2)
Muestras Proceso 2	20	12,5 (6,4 – 50,0)
Muestras Proceso 3	20	10,3 (6,0 – 43,5)
Muestras Proceso 4	20	10,8 (8,1 – 45,1)

Los datos están expresados como mediana y rango.

Se calculó la diferencia entre los datos de Hcy determinados luego de cada proceso respecto a la determinación inicial (*Proceso 1*). Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Diferencias de la Hcy en las muestras post-congelamientos.

	Δ (µM)	*Δ (%)*	*p*
Proceso 1 vs. 2	-0,5 [(-2,8) – (2,1)]	-2,2 [(-9,4) – (17,7)]	NS
Proceso 1 vs. 3	1,1 [(-0,8) – (3,7)]	8,8 [(-7,3) – (14,0)]	0.0003
Proceso 1 vs. 4	-0,1 [(-1,3) – (3,4)]	3,1 [(-15,7) – (14,2)]	NS

Los resultados están expresados como mediana y rango. El análisis estadístico se realizó con el *test* de Wilcoxon para muestras apareadas.

- ***Variabilidad biológica***

Se extrajo sangre a 23 individuos (rango de edades = 35 a 72 años) en ayunas y se obtuvieron las respectivas muestras plasmáticas con K_3EDTA. Se repitió la experiencia con los mismos sujetos 7 días después, sin indicaciones respecto a la ingesta dietaria. Los plasmas obtenidos de cada individuo en las dos extracciones fueron congelados a –20°C. La determinación de homocisteinemia para las 46 muestras se realizó en el mismo día, con el mismo equipo de ELISA.

Los valores de Hcy correspondientes a la primera extracción fueron 13,7 μM (6,0 – 40,4 μM), expresados como mediana y rango. Los niveles plasmáticos a los siete días resultaron 12,4 μM (4,9 – 50,0 μM). Los valores entre los dos grupos no mostraron diferencias significativas (*test* de Wilcoxon para muestras apareadas). Los valores (mediana y rango) se expresan a continuación: Δ (μM) = 0,3 [(-9,6) – (5,3)] y Δ (%) = 4 [(-23,7) – (24,6)].

DISCUSIÓN

Los estudios epidemiológicos que asocian a la hiperhomocisteinemia con el riesgo de enfermedad vascular oclusiva, muestran que pequeñas diferencias en los niveles de Hcy plasmática pueden tener importancia clínica. Por lo tanto, con el fin de disminuir la variabilidad de los resultados obtenidos para una muestra, se han realizado numerosas experiencias para la optimización de las fases pre-analítica y analítica (los errores inherentes a la fase post-analítica son similares a los de otras determinaciones del laboratorio clínico).

Respecto al tipo de muestra sanguínea, la mayoría de los trabajos internacionales utilizan plasmas en EDTA (obtenidos según lo descripto en *Materiales y Métodos*). Por lo tanto, la validación del método de ELISA se realizó con estas muestras. A partir de la confiabilidad y estandarización de esta técnica, se evaluaron los resultados obtenidos en distintas condiciones.

Los datos resumidos en la Tabla 6 muestran que para cada individuo, los niveles de Hcy determinados en plasmas con EDTA (*Muestras A*) resultan mayores que los obtenidos en citrato (*Muestras B*). Este efecto se mantiene aún cuando los valores se corrigen por el factor de dilución correspondiente, siendo el valor de la mediana de las diferencias igual a 15,4 % (p = 0,0001). Otros autores también han reportado que los datos de homocisteinemia obtenidos en muestras citratadas son inferiores a los correspondientes plasmas en EDTA[156]. Estos resultados se deberían no sólo a diferencias

de dilución sino también a efectos osmóticos e interacciones específicas con los analitos. Por el contrario, Palmer-Toy *et al.* encontraron concordancia entre los niveles de Hcy determinados en estas muestras, con el método de FPIA[157].

En los sueros obtenidos convencionalmente (*Muestras C*), la concentración de Hcy resultó mayor que la de los plasmas en EDTA (mediana de las diferencias = -14,4 %; p = 0,0001). En cambio, los sueros obtenidos con gel separador (*Muestras D*) mostraron valores de Hcy similares a los de las *Muestras A* (mediana de las diferencias = 3,3 %; p no significativa).

Los resultados de las muestras séricas coinciden con los reportes internacionales que sugieren que, aún *in vitro*, los eritrocitos continúan generando Hcy, liberándola al compartimiento extracelular[59,158]. De esta manera se produciría un incremento artificial de la concentración de Hcy cuando los elementos particulados de la sangre no son separados inmediatamente. Estos hallazgos explicarían los valores aumentados de Hcy en las *Muestras C*, ya que las mismas fueron obtenidas a partir de sangre entera, mantenida 4 hs a 37 °C y posterior centrifugación. En cambio, los niveles determinados en las *Muestras D* resultaron similares a los de las *Muestras A*, debido a que el gel separador contenido en los tubos evita el contacto del suero con los glóbulos rojos y blancos.

Las diferencias obtenidas entre los valores de Hcy en los sistemas analizados sugieren que los mismos no son comparables. Por lo tanto, considerando que la mayoría de los estudios (inclusive los que determinan valores de referencia) utilizan plasmas en EDTA, es conveniente realizar la determinación de Hcy con este tipo de muestra.

En este trabajo también se evaluó el efecto de congelamientos y descongelamientos sucesivos. La Tabla 9 muestra que las diferencias entre los valores de Hcy determinados en los *Procesos 1* y *2* y en los *Procesos 1* y *4* no resultaron estadísticamente significativas. Estos hallazgos coinciden con los reportes internacionales[159]. Si bien la diferencia entre los *Procesos 1* y *3* fue 8,8 % (p = 0,0003), este valor es semejante al coeficiente de variación intra-ensayo (8,4%) e inter-ensayo

(8,2%), lo que permite asumir que una variación de 8,8 % entre las dos series de datos sería un valor aceptable (del orden del error del método).

Otro de los objetivos del trabajo fue evaluar si variaciones inherentes al individuo (variabilidad biológica) podrían reflejar cambios en los niveles de Hcy. Los resultados obtenidos muestran que en un período de siete días no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, en algunos individuos la variación de su nivel de homocisteinemia alcanzó el 24,6 %. Esta diferencia estaría asociada principalmente a cambios en la ingesta alimentaria[60]. Además, deben considerarse posibles variaciones en la obtención de las muestras y el error inherente al método (para evitar las diferencias por el inter-ensayo se dosaron las 46 muestras simultáneamente con el mismo lote de reactivos).

Se concluyó que las muestras más apropiadas para la determinación de homocisteinemia son los plasmas en EDTA o sueros obtenidos con gel separador. Los valores determinados en las muestras conservadas a -70 °C no se ven afectados por los congelamientos y descongelamientos sucesivos. Respecto a la variabilidad biológica, podemos concluir que en períodos cortos de tiempo, no se observan cambios significativos en los niveles de Hcy de cada individuo.

FACTORES DETERMINANTES DE LA HOMOCISTEINEMIA

La concentración de homocisteína total en sangre refleja el nivel intracelular del aminoácido y la integridad de los pasos metabólicos involucrados. El valor de homocisteinemia es la resultante del efecto directo y de la interacción de factores genéticos y adquiridos. El aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína está asociado con las enfermedades vasculares oclusivas (a nivel arterial y venoso), por lo que el estudio de aquellos factores y de condiciones que provoquen un estado de hiperhomocisteinemia fueron los objetivos de esta parte de la tesis. Los determinantes evaluados fueron la edad, el sexo, los niveles de vitamina B_{12} y ácido fólico y la variante termolábil de la metilentetrahidrofolato reductasa.

HOMOCISTEINEMIA DE LA POBLACIÓN DE BUENOS AIRES

En el comienzo del desarrollo de esta tesis no se disponía de reportes referidos al estudio de la homocisteinemia en Argentina. Por lo tanto, una de las líneas de la investigación tuvo como objetivo realizar estudios que evaluaran los niveles de homocisteína plasmática en diversos grupos poblacionales de nuestro país.

Los niveles de Hcy plasmática se determinaron mediante la técnica de ELISA. En todos los casos se extrajo sangre por punción venosa a voluntarios con 8 horas de ayuno. Se obtuvieron los correspondientes plasmas en K_3EDTA, según el procedimiento descripto en la sección de *Materiales y Métodos.*

Durante un período de 6 meses se extrajeron las muestras sanguíneas correspondientes a individuos aparentemente sanos y en particular se excluyeron del estudio aquellos sujetos que declararon el uso de drogas que afectan los niveles de la Hcy; ser portadores de enfermedad vascular sintomática, enfermedad renal, psoriasis y otras patologías asociadas a incrementos en los niveles de Hcy.

Se evaluaron 305 individuos y fueron clasificados según la siguiente distribución etárea:

Grupo A: neonatos (n = 32).

Grupo B: 3 a 59 años (n = 151).

Grupo C: ≥ 60 años (n = 122).

Los niveles de Hcy para la población general o *Grupo B* mostraron una distribución normal (Figura 8) y los valores hallados se encuentran resumidos en la Tabla 10.

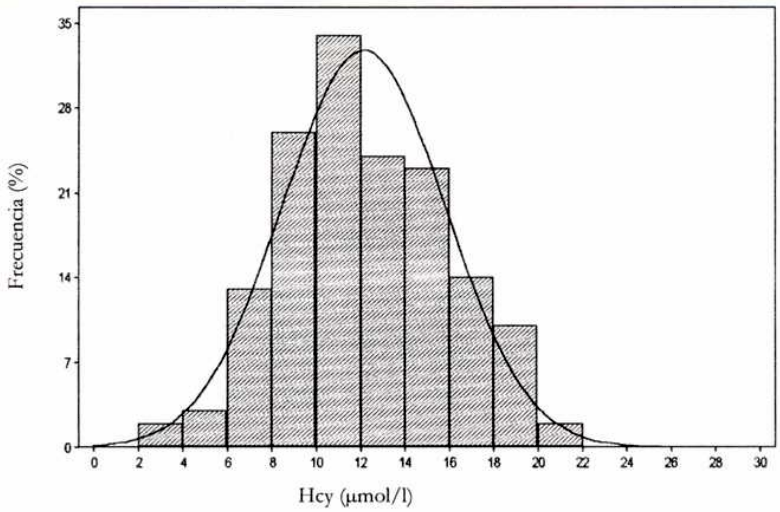


Figura 8. Distribución de frecuencias de homocisteinemia para la población general. Coeficiente de Shapiro-Wilks = 0,9914.

Tabla 10. Homocisteinemia en Buenos Aires. Resultados para la población general (3 a 59 años).

		Edad (años)		*Nivel plasmático de Hcy (µmol / l)*	
	n	*Media ± DE*	*Mediana (Rango)*	*Media ± DE*	*Mediana (Rango)*
Total	151	31,2 ± 14,0	30,0 (3-59)	12,1 ± 3,6	11,7 (3,1-20,1)
Hombres	58	28,0 ± 14,0	28,5 (3-59)	12,7 ± 3,8	12,4 (4,3-20,1)
Mujeres	93	32,7 ± 13,1	30,0 (4-59)	11,7 ± 3,4	11,5 (3,1-19,6)

DE: Desvío estándar. $Hcy_{Hombres} > Hcy_{Mujeres}$ ($p = 0,0493$; *test* de t).

Cuando al *Grupo B* se lo dividió por sexo, el análisis estadístico también mostró una distribución normal de frecuencias de la homocisteinemia para cada uno de los sexos. Los datos indicaron que el valor promedio de Hcy es significativamente mayor en los hombres que en las mujeres.

Para evaluar si la concentración plasmática de Hcy está relacionada con la edad, se ordenaron los sujetos del *Grupo B* en tres subgrupos etáreos. Los resultados correspondientes para cada subgrupo se muestran en la Tabla 11. Se observa que el

promedio de la concentración plasmática de Hcy aumenta con la edad, encontrándose diferencias significativas sólo entre el primer subgrupo y el segundo.

Tabla 11. Distribución de homocisteinemia según edad y sexo para la población general (3 a 59 años).

Edad (años)		*n*	*Nivel plasmático de Hcy (µmol /l)* Media ± DE	Mediana (Rango)	
3 – 19	*Total*	30	9,7 ± 3,6	8,9 (3,1 – 17,0)	$p^*_{(0)}$ = 0,0654
	Hombres	17	9,3 ± 3,3	8,5 (4,3 – 17,0)	
	Mujeres	13	10,3 ± 4,1	9,9 (3,1 – 15,6)	$p^{I}_{(t)}$ = 0,0001
20 – 39	*Total*	81	12,4 ± 3,3	12,0 (5,0 – 19,7)	$p^*_{(t)}$ = 0,0016
	Hombres	31	13,8 ± 3,0	14,1 (7,3 – 19,7)	
	Mujeres	50	11,6 ± 3,2	11,5 (5,0 – 18,5)	$p^{II}_{(t)}$ = 0,108
40 – 59	*Total*	40	13,3 ± 3,8	12,0 (6,8 – 20,1)	$p^*_{(t)}$ = 0,0402
	Hombres	10	15,1 ± 3,2	15,2 (10,6 – 20,1)	
	Mujeres	30	12,7 ± 3,8	11,6 (6,8 – 20,0)	

p^*: $Hcy_{Hombres}$ *vs.* $Hcy_{Mujeres}$; p^{I} : $Hcy_{3\text{-}19\ años}$ *vs.* $Hcy_{20\text{-}39\ años}$; p^{II} : $Hcy_{20\text{-}39\ años}$ *vs.* $Hcy_{40\text{-}59\ años}$.
(θ): Test de θ; (t): Test de t.

Se analizaron los datos correspondientes a dos grupos etáreos extremos, el de los neonatos (*Grupo A*) y el de los sujetos > 60 años (*Grupo C*). Los valores están resumidos en la Tabla 12. Los niveles de Hcy del *Grupo A* siguieron una curva de distribución normal, mientras que los correspondientes al *Grupo C* mostraron una distribución no normal, con valores *outliers* o atípicos a la derecha de la curva de Gauss. Nuevamente se observó que la concentración plasmática de Hcy aumenta con la edad encontrándose diferencias significativas entre los valores de homocisteinemia del *Grupo A vs. Grupo B* y entre el *Grupo B vs. Grupo C*.

Tabla 12. Distribución de homocisteinemia según edad. Análisis en grupos etáreos extremos.

	n	*Media ± DS*	*Mediana (Rango)*	*p*
Grupo A (neonatos)	32	6,4 ± 2,6	5,9 (2,4 – 10,3)	$p^{AB}{}_{(t)}$ = 0,0001
Grupo B (3-59 años)	151	12,1 ± 3,6	11,7 (3,1 – 20,1)	$p^{BC}{}_{(z)}$ = 0,007
Grupo C (> 60 años)	122	13,6 ± 5,9	12,7 (5,0 – 41,0)	

$p^{AB}{}_{(t)}$: Hcy_A *vs.* Hcy_B, *test* de t ; $p^{BC}{}_{(z)}$: Hcy_B *vs.* Hcy_C, *test* de z.

DISCUSIÓN

Basados en las evidencias de un número muy importante de estudios epidemiológicos, se ha postulado que la hiperhomocisteinemia está asociada a una mayor incidencia de aterosclerosis y trombosis. Estos hallazgos han planteado la necesidad de establecer un rango de referencia para los niveles de Hcy plasmática. Varios investigadores han recomendado que los valores de referencia para la concentración de Hcy plasmática total deben establecerse en poblaciones aparentemente sanas y además, con adecuado nivel vitamínico.

Se determinó la media y su desvío estándar en cada uno de los tres grupos etáreos principales: *Grupo A* (neonatos); 6,4 ± 2,6 µmol/l; *Grupo B* (3 – 59 años), 12,1 ± 3,6 µmol/l y *Grupo C* (> 60 años), 13,6 ± 5,9 µmol/l, observándose que los valores de homocisteinemia aumentan con la edad, aún dentro del *Grupo B*. También se encontró que los hombres muestran niveles de Hcy significativamente mayores que las mujeres. Esta diferencia entre los sexos tuvo significación estadística aún a pesar de que la media de las edades de las mujeres fue mayor que la de los hombres. Todos estos hallazgos coinciden con los presentados por otros autores[46].

Dado que la homocisteinemia es función de los niveles de folato, vitamina B_{12} y posiblemente vitamina B_6, Ubbink *et al.* [160] utilizaron los datos obtenidos en individuos sometidos a suplementación vitamínica y desarrollaron un modelo matemático para

establecer un rango de valores normales. De esta manera el intervalo para homocisteinemia propuesto fue de 4,9 a 11,7 µmol/l.. También Rasmussen y colaboradores[161] establecieron valores de referencia en una población con niveles óptimos de ácido fólico, obteniendo los siguientes rangos en función del sexo y la edad: 4,6 a 8,1 µmol/l para hombres y mujeres de 20 a 29 años; 4,5 a 7,9 µmol/l para mujeres y 6,3 a 11,2 µmol/l para hombres, de 30 a 59 años y 5,8 a 11,9 µmol/l para ambos sexos a partir de los 60 años.

Nuestro estudio mostró que el 95 % de los niveles plasmáticos de Hcy para la población de Buenos Aires con edad de 3 a 59 años, están comprendidos entre 5,0 y 19,2 µmol/l (calculado como la media ± 1,96 DE). Cabe cuestionarse si este rango corresponde al intervalo de referencia para homocisteinemia en nuestra ciudad. En un sentido, la respuesta sería afirmativa ya que estos valores fueron obtenidos del análisis estadístico propuesto por Altman[152], para aquellos datos de una población sana, con una distribución normal. Sin embargo, se ha propuesto que para determinar los valores de referencia para homocisteinemia se requiere la participación de individuos no sólo aparentemente en buen estado de salud, sino con niveles séricos óptimos de folatos, vitamina B_{12} y B_6. En nuestro estudio no se determinaron los niveles de estas vitaminas, pero dado el valor elevado del $percentilo_{97,5}$ = 19,2 µmol/l, podría sospecharse la presencia de deficiencias vitamínicas subclínicas en algunos de los individuos estudiados. En particular, es probable el déficit de folatos asociado a los hábitos alimentarios de nuestro medio (elevado consumo de proteínas de origen animal y baja ingesta de alimentos con alto contenido de ácido fólico). Además, nuestra población presenta una alta prevalencia de la variante termolábil de la metilentetrahidrofolato-reductasa (heterocigota 42,8 % y homocigota 15,8 %), cuya actividad disminuida se pone de manifiesto cuando la concentración de folatos no es la apropiada[23].

Uno de los trabajos más relevantes para establecer Valores Normales para homocisteinemia es el estudio NHANES III[65] (n =8.086 participantes). Estableció como niveles elevados de Hcy a aquellos valores mayores al $percentilo_{95}$ registrados en una

población sana, joven (edad 20–39 años), con un adecuado nivel sérico vitamínico y sin insuficiencia renal. Basados en este criterio, se definió como hiperhomocisteinemia a los niveles superiores a 10,4 µmol/l en las mujeres y 11,4 µmol/l en los hombres. Teniendo en cuenta este criterio, nuestra población de 3 a 59 años de edad presentó 44,1 % y 50,0 % de hiperhomocisteinemia, en mujeres y hombres respectivamente (NHANES III: 12,0 % y 20,8 %).

Los valores de homocisteinemia de la población de Buenos Aires, entre 3 y 59 años de edad, están comprendidos entre 5,0 y 19,2 µM. Este intervalo no debería considerarse como Rango de Referencia; por el contrario, sugiere que aproximadamente el 50% de nuestra población estaría expuesto a un mayor riesgo del desarrollo de aterotrombosis.

HOMOCISTEINEMIA Y RELACIÓN CON OTROS ANALITOS FISIOLÓGICOS EN INDIVIDUOS MAYORES DE 65 AÑOS

El estudio fue realizado en 196 individuos (62 hombres y 134 mujeres) con una edad de 75 años (66 a 93 años), expresada como mediana y rango. Todos los participantes fueron evaluados por personal médico, a través de una encuesta de síntomas, en relación con enfermedad coronaria, cerebral y periférica. Se completaron los datos mediante examen físico, electrocardiograma, e interrogatorio referido a factores de riesgo (tabaquismo, alcohol, estrés, sedentarismo), hábitos alimentarios, ingesta de suplementos vitamínicos y drogas. En los casos con antecedentes de enfermedad vascular, se recabaron datos objetivos del diagnóstico previo.

Se consideró portador de enfermedad vascular oclusiva a los pacientes con las siguientes patologías:

Arteriopatía periférica: Individuos con antecedentes de cirugía de *by-pass* aortofemoral o femoropoplíteo y aquellos con historia de claudicación intermitente y estudios que demostraron disminución de flujo arterial en miembros inferiores (ecografía Doppler, arteriografía o pletismografía).

Enfermedad cerebral isquémica: Individuos con antecedentes de déficit neurológico focal motor y/o sensitivo transitorio o con secuela y tomografía axial computada cerebral sin signos de hemorragia y pacientes con o sin síntomas con ecografía Doppler de vasos carotídeos con obstrucciones mayores al 20%.

Coronariopatía: Individuos con antecedentes de cirugía de revascularización miocárdica y/o angioplastias, pacientes con o sin antecedentes de dolor torácico y necrosis secuelar en el electrocardiograma, pacientes con antecedentes de dolor torácico con estudios complementarios positivos para isquemia (ergometría, ventriculograma) y aquellos con historia de dolor torácico y medicación antianginosa, en ausencia de estudios complementarios.

Se obtuvieron los plasmas en K_3EDTA y sueros correspondientes de todos los participantes. Se determinaron los niveles de Hcy, ácido fólico sérico y vitamina B_{12}.

Además, se dosaron los niveles de colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos y creatinina.

Como resultado de la evaluación clínica y de las pruebas de laboratorio, la población mostró las siguientes características (Tabla 13):

Tabla 13. Características de la población.

	%		Media (DE)
Diabéticos	17,0	*IMC (kg/m²)*	27,3 (4,7)
Hipertensos	70,6	*Colesterol$_{Total}$ (mg/dl)*	234,1 (39,9)
Sedentarios	64,3	*HDL (mg/dl)*	48,8 (7,8)
Fumadores	8,5	*Triglicéridos (mg/dl)*	125,2 (60,6)
Pacientes con EVO	17,3	*Creatinina (mg/dl)*	1,1 (0,2)

EVO: Enfermedad vascular oclusiva; IMC: Índice de masa corporal; HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

Los resultados de la determinación de homocisteinemia se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Niveles de Hcy plasmática.

	n	*Edad (años)*	*Hcy (μM)*	
Población total	196	75 (66 – 93)	12,8 (5,5 – 48,9)	
Hombres	62	72 (66 – 88)	14,0 (6,5 – 42,1)	$p = 0,005$
Mujeres	134	79 (68 – 93)	12,0 (5,5 – 48,9)	

Datos expresados como mediana y rango.

En la Tabla 15 figuran los valores de Hcy de los individuos con y sin enfermedad vascular (según los criterios descriptos).

Tabla 15. Niveles de Hcy plasmática.

	n	*Hcy (μM)*	
Población total	196	12,8 (5,0 – 48,9)	
Población sin EVO	162	12,6 (5,0 – 42,1)	*p* = NS
Población con EVO	34	13,9 (6,9 – 48,9)	

Datos expresados como mediana y rango.

Respecto a los niveles de vitaminas que afectan la concentración plasmática de Hcy, se encontraron los siguientes valores (expresados como mediana y rango):

- Vitamina B_{12} = 292 (48 – 1.500) pg/ ml
- Ácido fólico sérico = 4,44 (1,82 – 20,00) ng/ ml

Se analizó la asociación entre la homocisteinemia y los parámetros de laboratorio: vitamina B_{12}, ácido fólico, creatinina, triglicéridos, colesterol total y HDL-colesterol. El estudio de correlación de cada una de estas variables con los niveles de Hcy se realizó separadamente, evaluando en cada caso sólo aquellos individuos que mostraran valores normales de las variables restantes. La homocisteinemia correlacionó con los niveles de vitamina B_{12}, ácido fólico y creatinina (Tabla 16); mientras que no se encontró asociación con la concentración de triglicéridos, colesterol total ni de HDL-colesterol.

Tabla 16. Correlación entre los niveles de vitamina B_{12}, ácido fólico y creatinina y los niveles de Hcy.

	Hcy (μM)	
	r	*p*
Vitamina B_{12} (pg/ml)	- 0,387	< 0,001
Ácido fólico (ng/ml)	- 0,428	< 0,001
Creatinina (mg/dl)	0,537	< 0,001

r: Coeficiente de correlación de Spearman.

- ***Hiperhomocisteinemia y niveles vitamínicos***

Si se considera que el valor de corte para homocisteinemia es 15 μM, la proporción de individuos hiperhomocisteinémicos en la población evaluada resulta 34,4 % ($IC_{95\%}$ 27,7 – 41,6 %). En la Figura 9 se muestra la prevalencia del déficit de vitamina B_{12} y de ácido fólico en el grupo con hiperhomocisteinemia. Se observó que ningún individuo presentó las dos deficiencias simultáneamente.

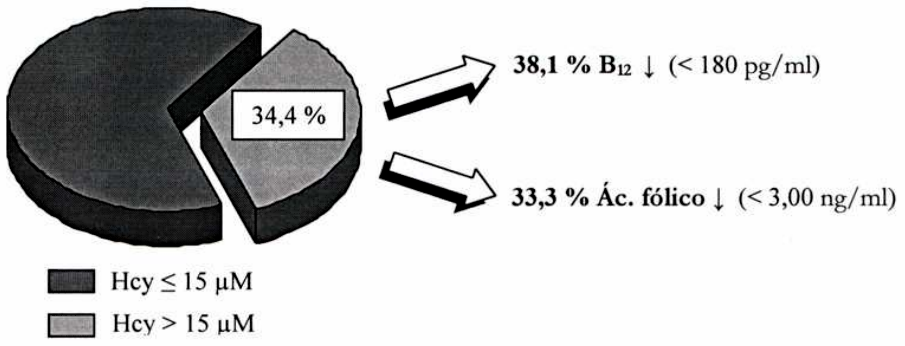


Figura 9. Deficiencias de vitamina B_{12} y ácido fólico en el grupo con hiperhomocisteinemia (Hcy > 15 μM).

Al analizar la concentración sérica vitamínica en toda la población, se observó que el 17,7 % presenta niveles subóptimos de vitamina B_{12} y el 24,2 % muestra déficit de ácido fólico. Los niveles de Hcy, expresados como mediana y rango, en ambos grupos resultaron 17,2 (9,5 – 40,4) μM y 17,0 (10,1 – 41,0) μM, respectivamente. La Figura 10 representa la proporción de sujetos hiperhomocisteinémicos en los grupos deficitarios de las vitaminas mencionadas.

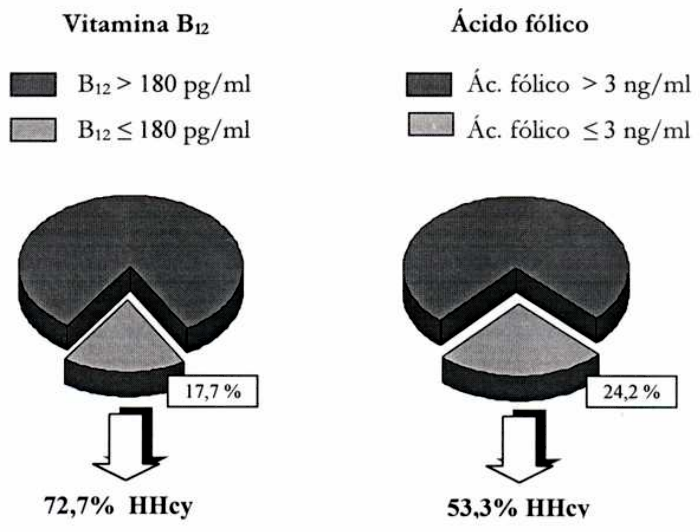


Figura 10. Prevalencia de hiperhomocisteinemia (HHcy), a partir de 15 μM, en individuos con deficiencias de vitamina B_{12} o ácido fólico.

DISCUSIÓN

Varios trabajos han reportado que los niveles plasmáticos de Hcy aumentan con la edad, dependiendo de factores nutricionales, metabólicos, alteraciones de la absorción de vitamina B_{12} y de la excreción renal. En el presente estudio la homocisteinemia de una población > 65 años resultó 12,8 μM (valor de la mediana), valor similar al hallado en nuestro estudio previo (12,7 μM; pág. 104). Además, en este grupo también resultó que los niveles de Hcy de los hombres (mediana = 14,0 μM) fueron significativamente más altos que los de las mujeres (mediana = 12,0 μM), coincidiendo con los resultados en la población de 3 a 59 años.

Si se considera el rango de valores normales como 5 – 15 μM[60], la prevalencia de hiperhomocisteinemia de la población añosa de Buenos Aires resulta 34,4 %. Este valor aumenta significativamente si se establece como valor de corte al propuesto por estudios más recientes. El estudio NHANES definió hiperhomo-cisteinemia (HHcy) a valores mayores de 11,4 μM en hombres y 10,4 μM en mujeres[65]. Teniendo en cuenta estos

niveles, la HHcy en la población estudiada alcanza valores muy altos (76,2 % y 66,4 % para los hombres y mujeres respectivamente).

Respecto a la concentración plasmática de Hcy en aquellos sujetos portadores de enfermedad vascular oclusiva (según los criterios enunciados) se observa que en estos individuos los valores de homocisteinemia resultaron más altos, aunque sin significación estadística, que en el resto de la población evaluada. Debe tenerse en cuenta que el diagnóstico de enfermedad vascular alude a la historia clínica de los individuos incorporados al estudio, pero no pretende tener relación directa con los niveles de Hcy de cada uno de ellos en el momento del estudio. Para establecer esta asociación deben realizarse estudios epidemiológicos prospectivos. Existen numerosos reportes internacionales que muestran esta relación: el estudio Rotterdam (n = 7.983) encontró que en sujetos > 55 años el incremento en 1 μM de los niveles de Hcy aumentó entre el 5 % y 10 % la ocurrencia de diversos eventos vasculares[96]. En un seguimiento de 4 años, los participantes con niveles mayores a 18 μM mostraron un aumento significativo del riesgo de infarto de miocardio y accidente cerebro-vascular comparado con los que tenían niveles inferiores a 12 μM. Un análisis del estudio Framingham (n = 1.933) relacionó la homocisteinemia con muerte por enfermedad cardiovascular en población anciana, durante 10 años[162]. Se encontró que con valores de Hcy mayores a 14,3 μM el riesgo relativo de mortalidad fue 2,2 ($IC_{95\%}$ 1,7 – 2,8) respecto a valores más bajos. El Proyecto Multicéntrico Europeo estudió la interacción entre la concentración plasmática de Hcy y factores de riesgo cardiovascular establecidos[66]. Se reportaron efectos multiplicativos y aún mayores, para las interacciones Hcy-hipertensión (*odds ratio* = 11) y Hcy-tabaquismo (*odds ratio* = 4,6). Entre los sujetos del presente estudio se observó un alto porcentaje de casos con hipertensión arterial (70,6 %) y 8,5 % de fumadores. Por lo tanto, la proporción de individuos con hiperhomocisteinemia e hipertensión sugiere que la población > 65 años sería un grupo con riesgo moderado a elevado de sufrir enfermedad vascular.

Respecto al estudio de la relación entre la homocisteinemia y otros analitos fisiológicos, se encontró que los niveles de Hcy correlacionaron significativamente con

los de vitamina B_{12} (r = - 0,387), ácido fólico (r = - 0,428) y creatinina (r = 0,537). Estos resultados concuerdan con lo reportados internacionalmente, que muestran una correlación positiva con la concentración de creatinina e inversa con cobalamina y folatos[55,74]. Entre las vitaminas involucradas en el metabolismo de la Hcy, se ha descripto que el ácido fólico presentaría la correlación con la homocisteinemia de mayor significación estadística[36,163].

En la población analizada se encontró que entre los sujetos con niveles de Hcy mayores a 15 μM, el 38,1 % mostró niveles disminuidos de vitamina B_{12} y el 33,3 %, valores bajos de ácido fólico sérico (ningún individuo presentó las dos deficiencias simultáneamente). Podríamos inferir que el 71, 4 % (sumatoria de ambos déficits) de la población con HHcy estaría relacionado con las deficiencias vitamínicas. El resto podría asociarse a factores tales como función renal alterada, presencia de ciertas patologías, estilos de vida, etc. Un análisis inverso indica que los individuos con niveles séricos subóptimos de vitamina B_{12} o de ácido fólico presentaron valores aumentados de Hcy. Con un valor de corte para Hcy = 15 μM, se encontró que la proporción de hiper-homocisteinémicos fue 72,7 % y 53,3 % respectivamente. Estos porcentajes se incrementan notablemente si se considera el valor de corte propuesto por el estudio NHANES.

Algunos trabajos han reportado que más del 90 % de pacientes con déficits de cobalamina o folatos han presentado niveles de Hcy elevados[164]. El aumento de homocisteinemia refleja la pérdida funcional de vitamina B_{12} y/o ácido fólico a nivel tisular, aún cuando los niveles séricos vitamínicos correspondan a valores normales[165,166]. Se ha observado una alta prevalencia de niveles séricos bajos de vitamina B_{12} y folatos en individuos sanos mayores de 65 años, sin evidencia clínica de déficits de estas vitaminas[167,168]. Además, se ha planteado que algunos métodos de rutina para el dosaje de vitamina B_{12} y ácido fólico muestran baja exactitud y precisión, limitando el valor diagnóstico de los mismos[169]. Por lo tanto, se ha recomendado la determinación de homocisteinemia para detectar deficiencias vitamínicas en poblaciones de riesgo, especialmente en ancianos[170,171].

En conclusión, la concentración plasmática de homocisteína en una población > 65 años mostró una estrecha relación con los niveles séricos de vitamina B_{12}, ácido fólico y creatinina. Se observó una alta prevalencia de hiperhomocisteinemia, asociada principalmente a niveles vitamínicos subóptimos.

EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO SOBRE LOS NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA

A los pacientes bajo tratamiento crónico de anticoagulación oral (ACO) se suele limitar la ingesta de vitamina K, con el objetivo de optimizar la estabilidad del rango terapéutico; por lo que se recomienda evitar el consumo de hígado y vegetales verdes. Estos alimentos también tienen un alto contenido de ácido fólico, coenzima clave en la regulación metabólica de la homocisteína. Por lo tanto, nuestra hipótesis fue que tales conductas terapéuticas podrían provocar deficiencia de folatos y consecuentemente aumento en los niveles de Hcy plasmática.

Para este estudio se seleccionaron 91 sujetos según los siguientes criterios de selección:

Inclusión: Pacientes con valvulopatías (con o sin reemplazo valvular), bajo tratamiento crónico de ACO con acenocumarol o warfarina, por un período mayor a 6 meses. Pacientes que presentaran las cuatro últimas determinaciones del RIN (Relación Internacional Normalizada) dentro del rango terapéutico.

Exclusión: Pacientes con insuficiencia renal crónica, psoriasis, hipotiroidismo o neoplasias. Sujetos con suplementación farmacológica de vitaminas y/o pacientes bajo tratamiento con drogas que afecten el metabolismo de la Hcy.

Los participantes fueron clasificados en:

- *Grupo I* (con restricción dietaria): 45 sujetos (16 M/29 H); de 66 años (21 – 89 años) (Mediana, rango)
- *Grupo II* (sin restricción dietaria): 46 sujetos (20 M/26 H); de 63 años (34 – 79 años) (Mediana, rango)

A cada paciente se extrajo sangre para la obtención de suero, plasma citratado, plasma en K_3EDTA y lisado de glóbulos rojos (ver sección *Materiales y Métodos*).

Se determinaron los valores de homocisteína, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), ferritina, creatinina sérica, vitamina B_{12}, ácido fólico sérico ($AF_{Sérico}$) y ácido fólico intraeritrocitario ($AF_{Intraerit.}$).

Los parámetros evaluados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Parámetros evaluados en los grupos bajo tratamiento de anticoagulación oral.

	Grupo I (n = 45)	*Grupo II (n = 46)*
Hematocrito (%)	42,6 (37,3 – 51,9)	43,0 (37,0 – 49,0)
VCM (fl)	90,9 (82,2 – 98,4)	92,0 (81,0 – 100,0)
*Ferritina **	Normal	Normal
Vit.B_{12} (pg/ml)	318,5 (123 – 1.500)	359,5 (48 – 730)
Creatinina (mg/dl)	1,1 (0,7 – 1,6)	1,1 (0,6 – 2,1)
Ac. fólico $_{Sérico}$ (ng/ml)	3,7 (1,0 – 20,0)	3,7 (1,5 – 8,5)
Ac. fólico $_{Intraeritrocitario}$ (ng/ml)	145 (61 – 725)	248 (178 – 437)
Homocisteína (μM)	15,8 (7,6 – 50,0)	14,8 (5,6 – 42,1)

Los parámetros están expresados como mediana y rango.
* En la evaluación de los resultados se consideró el sexo y la condición hormonal para las mujeres.

Dado que el objetivo del trabajo fue evaluar el impacto de las pautas alimentarias sobre los niveles de folatos y Hcy en pacientes bajo ACO, debieron excluirse del estudio aquellos individuos con factores que potencialmente podrían provocar hiper-homocisteinemia (fundamentalmente déficit de B_{12} y función renal alterada). Según los valores de referencia del método utilizado, se considera deficiencia estricta de B_{12} a niveles séricos $\leq$ 145 pg/ml; sin embargo los valores normales corresponden a una concentración $\geq$ 180 pg/ml. Teniendo en cuenta estos valores de corte para la vitamina

B_{12} y niveles ≤ 1,4 mg/dl para la creatinina, debieron excluirse del estudio algunos pacientes. Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 18 y 19.

Tabla 18. Homocisteinemia y niveles de ácido fólico en pacientes con valores de B_{12} ≥ 145 pg/ml.

	Grupo I (n = 31)	*Grupo II (n = 32)*	*p*
Homocisteinemia (µM)	16,8 (10,4 – 50,0)	13,6 (5,6 – 22,6)	< 0,001
Ácido fólico$_{Sérico}$ (ng/ml)	3,7 (1,0 – 6,1)	3,6 (1,5 – 8,3)	NS
Ácido fólico$_{Intraeritr.}$ (ng/ml)	138 (61 – 538)	242 (178 – 437)	< 0,0001

Todos los pacientes incluidos presentaron concentración sérica de creatinina ≤ 1,4 (mg/dl).
Los parámetros están expresados como mediana y rango. La comparación estadística se realizó con el *test* de Mann- Whitney.

Tabla 19. Homocisteinemia y niveles de ácido fólico en pacientes con valores de B_{12} ≥ 180 pg/ml.

	Grupo I (n = 22)	*Grupo II (n = 24)*	*p*
Homocisteinemia (µM)	15,8 (10,4 – 26,5)	12,4 (5,6 – 22,6)	0,0025
Ácido fólico$_{Sérico}$ (ng/ml)	3,7 (2,0 – 6,1)	3,5 (1,5 – 8,3)	NS
Ácido fólico$_{Intraeritr.}$ (ng/ml)	136 (85 – 538)	240 (178 – 437)	< 0,0001

Todos los pacientes incluidos presentaron concentración sérica de creatinina ≤ 1,4 (mg/dl).
Los parámetros están expresados como mediana y rango. La comparación estadística se realizó con el *test* de Mann- Whitney.

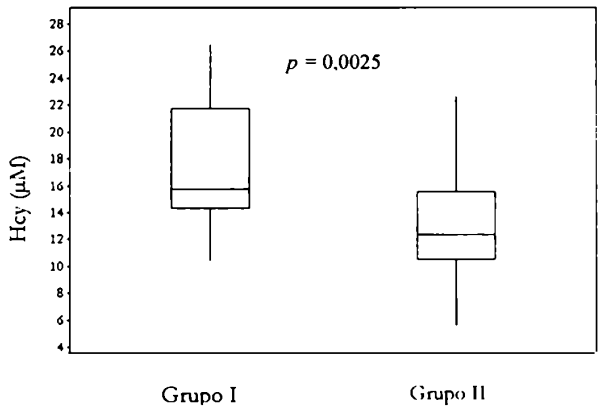


Figura 11. *Box & Whisker Plots* para los valores de homocisteinemia. La comparación estadística se realizó con el *test* de Mann- Whitney.

Las Figuras 11, 12 y 13 representan los valores de Homocisteinemia, Ácido Fólico Sérico y Ácido Fólico Intraeritrocitario, en los dos grupos evaluados, considerando el criterio de inclusión más riguroso: Niveles de vitamina $B_{12} \geq 180$ pg/ml y creatinina sérica $\leq 1,4$ mg/dl.

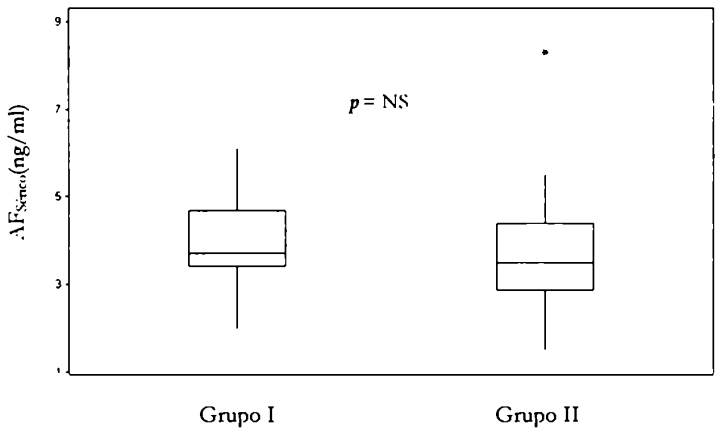


Figura 12. *Box & Whisker Plots* de ácido fólico sérico ($AF_{Sérico}$). La comparación estadística se realizó con el *test* de Mann- Whitney.

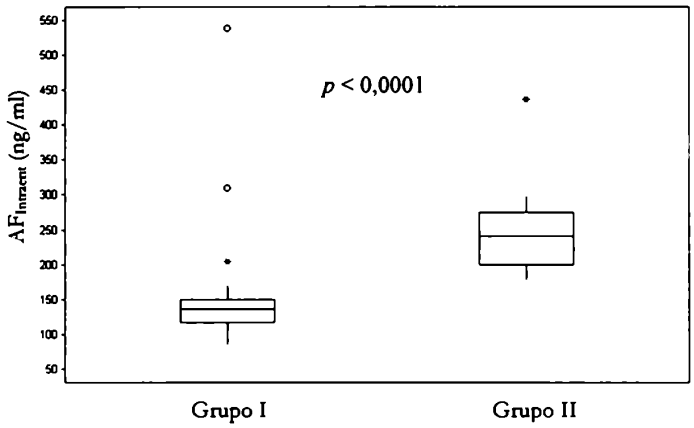


Figura 13. *Box & Whisker Plots* de ácido fólico intraeritrocitario ($AF_{Intraerit.}$). La comparación estadística se realizó con el *test* de Mann- Whitney.

La evaluación de la encuesta alimentaria confirmó que el consumo de vegetales verdes en los pacientes del Grupo I fue significativamente menor que en el Grupo II.

Paralelamente, en el Grupo I se observó una proporción elevada de sujetos con valores de ácido fólico intraeritrocitario ($AF_{Intraerit.}$) menores al valor de referencia (164 ng/ml). Por el contrario, todos los sujetos del Grupo II mostraron niveles de $AF_{Intraerit.}$ superiores al valor de corte (Figura 13). Excluyendo a aquellos pacientes con niveles subóptimos de vitamina B_{12}, el porcentaje de pacientes con déficit de $AF_{Intraerit.}$ resultó 77,3 % ($IC_{95\%}$ 56,6 – 91,2) y 0 % ($IC_{95\%}$ 0 – 14,2) en el Grupo I y Grupo II, respectivamente (Figura 14). Ninguno de los deficitarios de $AF_{Intraerit.}$ del Grupo I presentó macrocitosis.

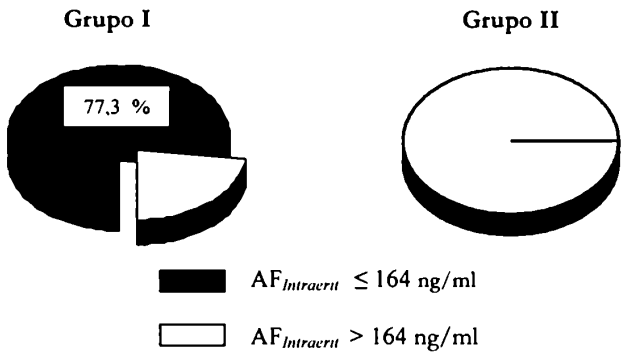


Figura 14. Proporción de pacientes con valores normales y subóptimos de ácido fólico intraeritrocitario ($AF_{Intraerit.}$). Diferencia entre grupos altamente significativa (*Test* asintótico, $p < 0{,}0001$).

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto que podría provocar una dieta restringida en vegetales verdes sobre los niveles plasmáticos de Hcy. Con este fin se determinó la homocisteinemia en pacientes bajo tratamiento anticoagulante oral (como modelo de población con restricción dietaria). En este tipo de terapéutica se administran compuestos cumarínicos (warfarina, acenocumarol y otros) que interfieren en el metabolismo de la vitamina K, disminuyendo los niveles de vitamina K reducida indispensable, junto al O_2 y CO_2, para la *gamma* carboxilación de los residuos glutámicos de ciertos factores e inhibidores del sistema de coagulación (FII, FVII, FIX, FX, proteína C y proteína S). La interferencia de la γ carboxilación de los factores K dependientes resulta en una actividad coagulante disminuida de las proteínas mencionadas.

Para conferir estabilidad en los niveles de anticoagulación oral (ACO), en numerosos centros hematológicos se recomienda a los pacientes reducir la ingesta de alimentos ricos en vitamina K. Una de las fuentes naturales de esta vitamina son los

vegetales verdes, que además tienen alto contenido de ácido fólico; por lo tanto esta restricción dietaria podría inducir deficiencia de folatos y secundariamente hiperhomocisteinemia.

Un primer análisis de los datos obtenidos en los *Grupos I* y *II* (Tabla 17) muestra que los niveles de ácido fólico sérico ($AF_{Sérico}$) fueron similares en cada uno de los grupos, en cambio los de ácido fólico intraeritrocitario ($AF_{Intraerit.}$) resultaron muy diferentes: el valor de la mediana en el Grupo I (145 ng/ml) fue menor al límite inferior normal (164 ng/ml); mientras que todos los sujetos del grupo sin restricción dietaria mostraron niveles superiores al valor de corte.

La concentración plasmática de Hcy fue mayor en el *Grupo I* respecto al *Grupo II*, aunque sin significación estadística.

Como el objetivo del estudio fue evaluar la incidencia de la dieta sobre los niveles de folatos y de Hcy, se realizó un nuevo análisis de los datos, excluyendo los correspondientes a pacientes que presentaran factores asociados a hiperhomocisteinemia, principalmente función renal alterada y/o deficiencias de vitamina B_{12}. Para esta evaluación se analizaron los datos de ácido fólico y Hcy de aquellos sujetos con concentración sérica de creatinina $\leq$ 1,4 mg/dl y de vitamina $B_{12} \geq$ 145 pg/ml (Tabla 18). Las observaciones respecto a los niveles de ácido fólico sérico e intraeritrocitario resultaron similares a las ya enunciadas; no así para la homocisteinemia que resultó significativamente más elevada en el *Grupo I* que en el *Grupo II*.

Con un criterio de selección aún más riguroso, se evaluaron sólo los pacientes con concentración sérica de vitamina B_{12} superior al valor normal, 180 pg/ml, según referencia del método utilizado (Tabla 19). En este análisis también los niveles de Hcy fueron significativamente mayores en los sujetos con restricción dietaria que en los pacientes sin dieta condicionada. Respecto a los niveles de folatos se mantuvieron las conclusiones de los análisis previos.

Todos los pacientes incluidos en este estudio estuvieron bajo tratamiento crónico de ACO por un período $\geq$ 6 meses, alcanzando en algunos casos a 5 años. Por

consiguiente, los individuos pertenecientes al *Grupo I* tuvieron una ingesta limitada de vegetales verdes durante, al menos, el mismo tiempo del tratamiento de ACO. Este hecho explicaría que los niveles de $AF_{Intraerit}$ en el *Grupo I* resultaran significativamente disminuidos respecto a los del *Grupo II*. Es conocido que el valor de $AF_{Intraerit.}$ es el mejor indicador de los depósitos de folatos porque no está influenciado por la ingesta dietaria reciente ni por drogas, pero sí por el nivel de cobalamina[170]. En deficiencias de esta vitamina, el $AF_{Sérico}$ (5-metilTHF) tiende a aumentar como resultado de la "trampa de folato", bloqueando el ingreso del $AF_{Sérico}$ al interior de la célula y en particular del eritrocito[172]. La menor disponibilidad del sustrato 5-metilTHF disminuye la síntesis de poliglutamatos, componente principal del $AF_{Intraerit}$ [173]. Como consecuencia, un déficit de vitamina B_{12} conduce a valores bajos de $AF_{Intraerit.}$, aún con una ingesta adecuada de folatos. En nuestro estudio la evaluación de la proporción de pacientes con niveles de $AF_{Intraerit}$ menores al valor de corte (164 ng/ml) se realizó sólo en aquellos individuos que presentaran valores óptimos de cobalamina. En estos pacientes, el 77,3 % del *Grupo I* mostró déficit de $AF_{Intraerit}$, mientras que en el *Grupo II* no se detectó ningún deficitario. Estos resultados también serían consecuencia de las pautas alimentarias.

Respecto a la concentración de $AF_{Sérico}$ se observaron resultados similares en los dos grupos, con valor de la mediana mayor al valor normal (3,0 ng/ml). Si bien los niveles $AF_{Sérico}$ constituyen un indicador sensible a la ingesta reciente de folatos, los resultados obtenidos en ambos grupos sugerirían que con una dieta restringida en ácido fólico durante un período prolongado, los niveles de $AF_{Sérico}$ tienden a normalizarse a expensas de que el $AF_{Intraerit}$ disminuye.

En conclusión, los pacientes bajo tratamiento crónico de ACO con restricción de ingesta de vegetales verdes con alto contenido de vitamina K y folatos, mostraron un déficit importante de ácido fólico intraeritrocitario. Los niveles plasmáticos de homocisteína en estos sujetos fueron significativamente más altos que en los individuos sin restricción dietaria.

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN VITAMÍNICA SOBRE LOS NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA

La respuesta de los individuos con hiperhomocisteinemia a los tratamientos terapéuticos, no es uniforme y es dependiente de diferentes factores, fundamentalmente del estado nutricional del individuo y su genotipo para las enzimas involucradas en el metabolismo de la Hcy. Las intervenciones que han sido probadas incluyen aumento del aporte de ácido fólico por alguno de los siguientes métodos: *a)* ingesta de alimentos con alto contenido de dicha vitamina; *b)* fortificación de determinados productos de consumo elaborados y/o *c)* suplementación farmacológica con la adición, en la mayoría de los casos, de vitaminas B_{12} y B_6.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la magnitud del descenso de los niveles de Hcy por el aporte de ácido fólico, administrado en la dieta y en combinación con suplementación farmacológica.

Se evaluó la respuesta a la suplementación con ácido fólico, en 50 individuos ambulatorios mayores de 65 años. La duración del tratamiento fue de 60 días. Los participantes fueron aleatoriamente asignados a uno de los siguientes grupos, recibiendo el tratamiento correspondiente:

Grupo I: Dieta conteniendo alimentos que proveen 400 µg/día de ácido fólico más un comprimido como placebo.

Grupo II: Dieta conteniendo alimentos que proveen 400 µg/día de ácido fólico más un comprimido conteniendo 1 mg de ácido fólico, 1 mg de vitamina B_{12} y 25 mg de vitamina B_6.

Grupo III: Dieta conteniendo alimentos que proveen 400 µg/día de ácido fólico más un comprimido conteniendo 2,5 mg de ácido fólico, 1 mg de vitamina B_{12} y 25 mg de vitamina B_6.

Los tres grupos no difirieron en edad, sexo, otros factores de riesgo vascular ni en antecedentes de eventos oclusivos arteriales recientes. Los niveles medios de Hcy antes

del ingreso al estudio, fueron similares en los tres grupos. Ninguno de los participantes presentaba factores asociados a hiperhomocisteinemia. Ninguno de ellos era vegetariano, ni recibió suplementos vitamínicos durante los 12 meses previos a la incorporación al estudio.

A todos los sujetos se les entregó por escrito una lista de alimentos con alto contenido de ácido fólico (AF). Las porciones detalladas equivalen a 100 µg de AF.

Para ingerir los 400 µg/día de AF indicados para los tres grupos, cada paciente seleccionó cuatro porciones diarias iguales o diferentes.

Dieta

- 3 naranjas chicas (100 g) ó 2 medianas (150 g)
- 4 bananas chicas (100 g) ó 3 medianas (150 g)
- 4 tomates pequeños ó 2 grandes (200 g)
- ½ taza de espinacas cocidas
- 2 huevos enteros
- 1 remolacha mediana (150 g)
- 3 rodajas de melón (100 g)
- ½ taza de brócolis cocidos
- 2 tazas de coliflor
- ¾ taza de repollo de Bruselas
- 100 g de hígado

De cada individuo se extrajeron muestras sanguíneas (con 8 hs de ayuno), *pre* y *post-tratamiento*. Se obtuvieron los plasmas en K_3EDTA y se congelaron a -70 °C hasta su procesamiento.

Finalizaron el estudio 44 individuos, los que manifestaron un cumplimiento estricto del régimen alimentario. Las características de los individuos evaluados se muestran en la Tabla 20.

El valor de Hcy (*pre-tratamiento*) en la población total (n = 44) resultó 18,1 µM (9,5 - 41,2 µM), expresado como mediana y rango; mientras que la Hcy (*post-tratamiento*) descendió a 6,6 µM (2,0 - 17,0 µM). El descenso en los niveles de Hcy fue muy significativo, alcanzando el 63,2 % (18,1 - 87,9 %). Los resultados para cada grupo se muestran en la Tabla 21 y Figura 15.

Tabla 20. Características generales de la población en estudio.

	Grupo I	*Grupo II*	*Grupo III*
	n=12	*n =18*	*n =14*
Hombres (%)	34	50	57
Mujeres (%)	66	50	43
Edad (años) *(mediana, rango)*	73 (67-80)	73 (67-81)	74 (67-81)
Hipertensos (%)	42	50	43
Diabéticos (%)	25	17	14
IMC >30 kg/m^2 (%)	8	11	7
Fumadores (%)	12	11	14
E.V.O. (%)	8	5	7
Sedentarios (%)	83	60	60

IMC: Índice de masa corporal; E.V.O. : Pacientes con enfermedad vascular oclusiva sintomática.

Tabla 21. Respuesta de los niveles de homocisteinemia al tratamiento vitamínico.

	n	*Hcy $_{pre\text{-}tratamiento}$* *(μM)*	*Hcy $_{post\text{-}tratamiento}$* *(μM)*	*Δ* *(μM)*	*Descenso* *(%)*	*p*
Grupo I	12	18,7 (12,3 – 28,5)	8,0 (3,4 – 12,2)	11,2 (2,7 – 24,0)	62,4 (18,1 – 84,2)	0,0002
Grupo II	18	18,1 (12,2 – 28,5)	6,2 (2,0 – 12,0)	11,6 (5,3 – 22,6)	64,8 (41,4 – 85,5)	0,0001
Grupo III	14	18,0 (9,5 – 41,2)	6,9 (2,6 – 17,0)	11,2 (4,5 – 28,9)	60,4 (27,6 – 87,9)	0,0001

Hcy: Concentración plasmática de homocisteína; Δ: Diferencia entre Hcy pre-tratamiento y Hcy post-tratamiento. Los parámetros están expresados como mediana y rango.

Finalizados los tratamientos, no se observaron diferencias significativas en los valores de homocisteinemia de los individuos que recibieron sólo dieta (*Grupo I*) respecto de los que recibieron suplementación farmacológica adicional (*Grupos II* y *III*).

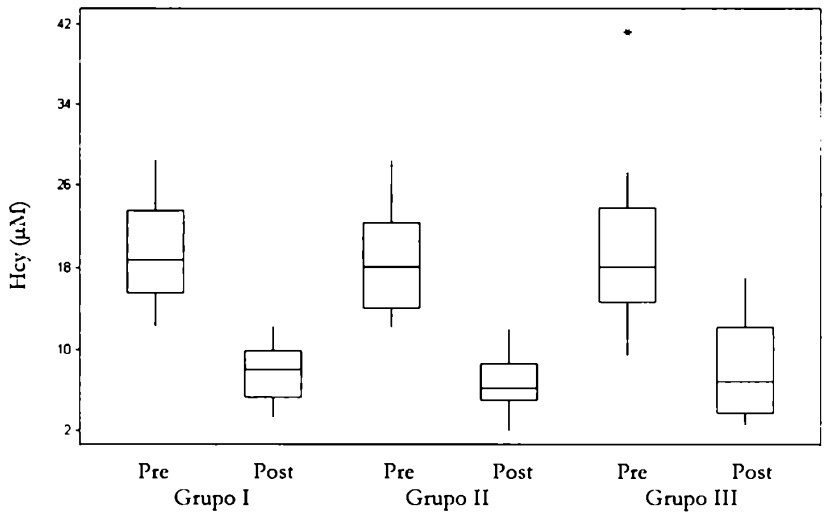


Figura 15. *Box & Whisker Plots* de los niveles de Hcy antes (Pre) y después (Post) de los tratamientos administrados.

Por análisis de regresión lineal se observó una buena correlación entre los niveles iniciales de Hcy (pre-tratamiento) y el grado de respuesta de la homocisteinemia, expresada como la diferencia Hcy_{Pre} - Hcy_{Post}. El coeficiente de correlación de Spearman fue 0,745 ($p < 0{,}01$) (Figura 16).

Los niveles de homocisteinemia post-tratamiento alcanzaron valores ≤ 5 µM en 14/44 sujetos (31%), distribuidos homogéneamente en los tres grupos.

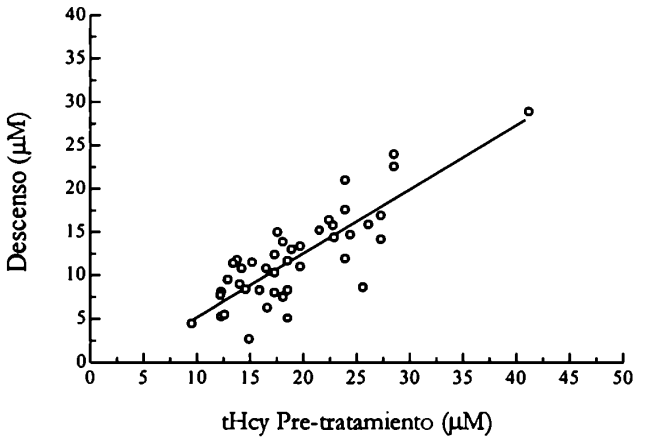


Figura 16. Regresión lineal entre el descenso de los niveles de homocisteinemia *vs.* los valores iniciales de Hcy. $y = 2{,}243 + 0{,}737\,x$ ($n = 44$; $r = 0{,}745$).

DISCUSIÓN

Considerando que todos los participantes del estudio tuvieron un alto cumplimiento de la dieta, la efectividad de la misma se demostró en la respuesta observada en el *Grupo I*. El descenso de los niveles de homocisteinemia fue altamente significativo en todos los casos (*mediana* = 11,4 µM; $n = 44$) y resultó similar en los tres grupos. Estos resultados indican que una dieta que provee 400 µg/día de ácido fólico es suficiente para disminuir significativamente la concentración plasmática de Hcy. Como se muestra en la regresión lineal (Figura 16), el descenso fue muy importante, aún en 12 individuos con valores iniciales de Hcy ≤ 15 µM.

Los datos publicados sobre el efecto de la administración farmacológica de ácido fólico (dosis = 0,5 – 5 mg/día), señalan un descenso promedio del 25 % del valor inicial de homocisteinemia. El agregado de vitamina B_{12} (dosis promedio = 0,5 mg/día) provocó una reducción del 7 %, mientras que la vitamina B_6 (16,5 mg/día) no produjo

efecto adicional significativo[174]. Se reportan pocos estudios que hayan evaluado la respuesta al ácido fólico, aportado por la dieta. I. Brower *et al.* registró que la ingesta de vegetales y cítricos que proveen 560 μg/día de folatos (sujetos entre 18 y 45 años de edad), diminuye significativamente (media = 2,0 μM) la concentración plasmática de Hcy. El grado de respuesta de nuestro estudio resultó mucho mayor (media = 10,8 μM). Esta reducción tan significativa en los niveles de homocisteinemia sugiere que los individuos evaluados serían portadores de deficiencias subclínicas de ácido fólico.

En conclusión, el presente estudio muestra que en una población > 65 años la ingesta de una dieta que aporte 400 μg de ácido fólico por día, disminuye significativamente los niveles de homocisteína plasmática.

RELACIÓN ENTRE LA HOMOCISTEINEMIA Y EL POLIMORFISMO C677T DE LA MTHFR

La metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) es una de las enzimas involucradas en el metabolismo de la homocisteína. La sustitución en el nucleótido 677 (citosina por timina) de la MTHFR da como resultado una variante termolábil con actividad enzimática disminuida. Si bien la sustitución C677T en el gen de la MTHFR se ha asociado con hiperhomocisteinemia y riesgo de enfermedad vascular, existen numerosas controversias al respecto. Por lo tanto, en esta sección de la tesis se estudió la relación entre la concentración plasmática de Hcy y la presencia de la variante termolábil en individuos homocigotas y heterocigotas de nuestra población.

Se evaluaron 160 individuos (89 M/71 H) no relacionados, con una edad, expresada como mediana y rango, de 37 años (19 – 65 años). Se excluyeron individuos que presentaban causas evidentes de hiperhomocisteinemia.

De cada participante se extrajo sangre en ayunas y se recolectó en tubos con K_3EDTA. Se separaron 2 ml de la sangre entera anticoagulada y el resto se procesó para la obtención de plasma (según las recomendaciones para determinar Hcy). Las muestras se congelaron a –70 °C hasta su procesamiento.

A partir de las muestras de sangre entera se extrajo ADN y se determinó el genotipo de cada individuo para la posición 677 del gen de la MTHFR por técnicas de biología molecular: amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento de 198 pares de bases y digestión posterior del mismo con la enzima de restricción Hinf I (ver sección *Materiales y Métodos*).

Las electroforesis de los productos de PCR incubados mostraron, según el genotipo, un patrón de bandas como el indicado en la Figura 17. De acuerdo al perfil obtenido se realizó el diagnóstico de cada muestra. Para los tres genotipos posibles se utiliza la siguiente denominación:

Normal	individuo homocigota CC
Heterocigota	individuo heterocigota CT
Homocigota	individuo homocigota TT

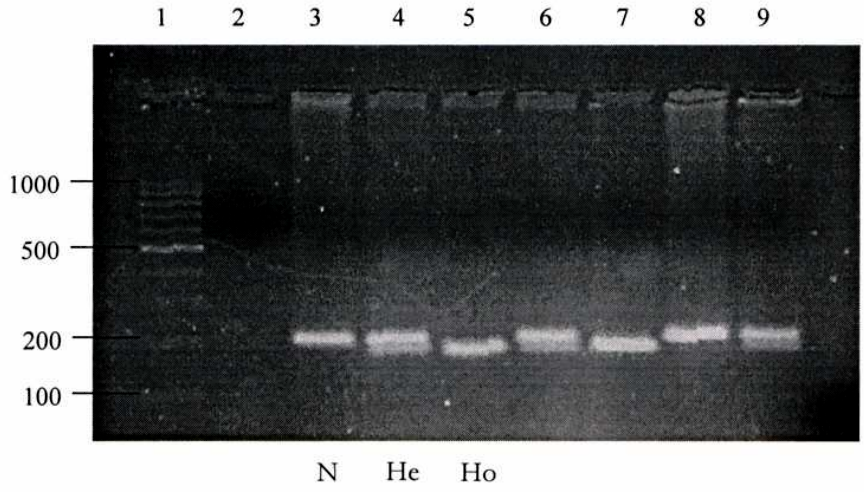


Figura 17. Corrida electroforética de los productos de PCR incubados con Hinf I. N: *Normal* (CC), calles 3 y 8; He: *Heterocigota* (CT), calles 4, 6 y 9; Ho: *Homocigota* (TT), calles 5 y 7. Calle 1: marcadores de peso molecular (de 1000 a 100 pares de bases).

Del análisis genotípico resultó la siguiente distribución: 33,8 % C677C; 50,0 % C677T y 16,2 % T677T.

Paralelamente, en los plasmas de cada individuo se determinaron los niveles de Hcy, resultando el valor promedio y el DE = 12,5 ± 4,4 μM. La relación entre los valores de homocisteinemia y el polimorfismo de la MTHFR se muestran en la Tabla 22 y la Figura 18.

Tabla 22. Niveles de Hcy (μM) para cada genotipo.

	n	*Media ± DE*	*Mediana (rango)*	
Normal (C677C)	54 (29 M/ 25 H)	12,0 ± 4,4	11,3 (5,4 – 22,2)	*NS*
Heterocigota (C677T)	80 (43 M/ 37 H)	12,1 ± 4,1	11,9 (3,0 – 22,4)	*p = 0,02*
Homocigota (T677T)	26 (15 M/ 11 H)	14,3 ± 5,0	14,0 (5,0 – 28,5)	*p = 0,025*

M: Mujeres; H: Hombres. Comparación estadística: *test* de Mann-Whitney.

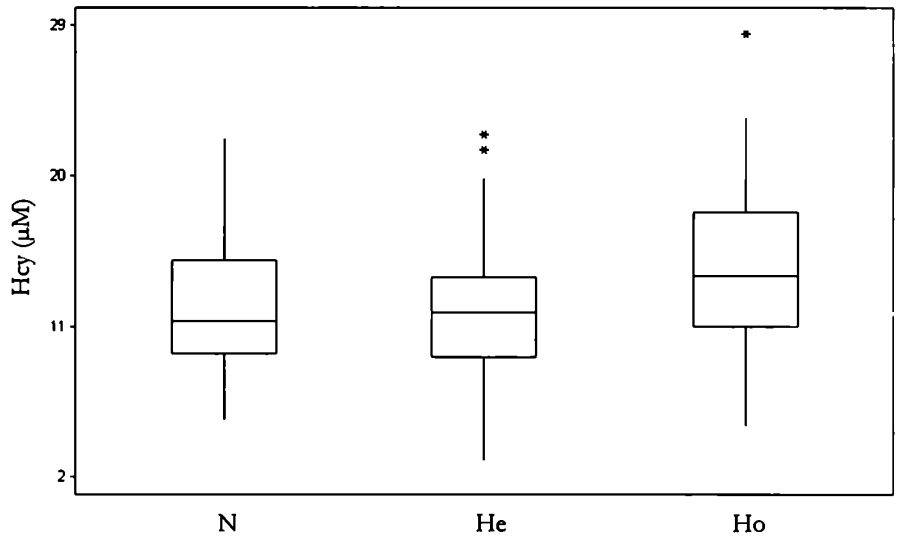


Figura 18. *Box & Whisker Plots* de homociteinemia para los individuos normales (N), heterocigotas (He) y homocigotas (Ho).

DISCUSIÓN

La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) cataliza la conversión del 5,10-metilentetrahifrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, sustrato proveedor del grupo metilo, indispensable para la remetilación de la Hcy. Se ha descripto una mutación común de la MTHFR, en la que se reemplaza citosina por timina en la posición 677 del gen, que se

traduce en un cambio de alanina por valina (mutación *missense*). Este cambio genera una variante termolábil de la enzima (sensible al calentamiento a 46 °C durante 5 minutos), con reducida actividad catalítica a 37 °C[175]. La presencia de esta alteración se asociaría a menores niveles de 5-metiltetrahidrofolato y consecuentemente a un aumento en la concentración de Hcy[176].

En el presente estudio se determinaron los niveles de Hcy y el genotipo en la posición 677 del gen de la MTHFR en 160 individuos aparentemente sanos. El valor medio de homocisteinemia en la población analizada (12,5 ± 4,4 μM) no mostró diferencias significativas respecto al hallado en la evaluación de "Homocisteinemia de la población de Buenos Aires" (12,1 ± 3,6 μM; pág. 102). Además, la distribución genotípica del polimorfismo de la MTHFR (*Normal* 33,8 %; *Heterocigota* 50,0 % y *Homocigota* 16,2 %) resultó similar a la reportada en un estudio multicéntrico de la Argentina (*Normal* 41,4 %; *Heterocigota* 42,8 % y *Homocigota* 15,8 %)[23]. Estos resultados avalan la representatividad de la muestra seleccionada.

La tabla 22 y la Figura 18 muestran los niveles de Hcy para cada genotipo, observándose que sólo los individuos homocigotas TT presentaron valores de Hcy significativamente más altos que los individuos heterocigotos (CT) y normales (CC). Estos resultados concuerdan con trabajos internacionales que han encontrado asociación entre el genotipo TT y la hiperhomocisteinemia leve a moderada[18,22,177]. Algunos investigadores sugirieron que esa asociación sólo se observaría cuando la concentración de folatos es reducida en los individuos portadores de la mutación en homocigosis. Sin embargo, otros estudios han reportado que el genotipo TT afecta los niveles de Hcy plasmática aún cuando la concentración de folatos es óptima[178].

En nuestro estudio se encontró que los niveles de homocisteína plasmática son afectados por la presencia del alelo T de la MTHFR, sólo en individuos homocigotas para la mutación. En estos sujetos el valor de homocisteinemia resultó significativamente mayor respecto a los heterocigotas y a los normales.

HOMOCISTEINEMIA Y TROMBOSIS VENOSA

La trombosis es una enfermedad multicausal en la que interactúan dinámicamente factores genéticos y adquiridos. El impacto de un factor de riesgo es una función de su prevalencia y del riesgo relativo. Por lo tanto, establecer los factores de riesgo asociados a la trombosis permitirá implementar medidas de prevención y terapéuticas para la enfermedad.

Se determinó el valor de corte de homocisteinemia por debajo del cual no se observa riesgo de trombosis venosa. Además, se estudió la relación de esta patología con el polimorfismo C677T de la MTHFR.

DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA HOMOCISTEINEMIA

Las evidencias epidemiológicas postulan que los niveles elevados de Hcy se asocian a una incidencia incrementada de episodios aterotrombóticos. Estos hallazgos han planteado la necesidad de establecer un valor de corte para la homocisteinemia, por debajo del cual no se observe riesgo de enfermedad vascular oclusiva; clásicamente se considera 15 μM, aunque aún no existe concordancia a nivel internacional respecto a los valores normales. Por lo tanto, uno de nuestros objetivos propuestos fue determinar el valor de corte para homocisteinemia asociado al riesgo trombótico (se consideró sólo trombosis venosa, TV).

Grupo Trombótico (GT): 118 pacientes (60 M/58H) con episodios de TV.
Edad (mediana y rango) = 37 años (23 – 58 años).

Grupo Control (GC): 115 individuos sanos (65 M/50 H).
Edad (mediana y rango) = 32 años (20 – 55 años).

Cada paciente del *Grupo Trombótico* fue incorporado al estudio a los siete días de haber sufrido el episodio de TV. En este grupo no fueron incluidos pacientes con trombosis venosa post-quirúrgica, ni asociada a neoplasia, diabetes o embarazo. La determinación de la concentración de Hcy de todos los participantes se realizó en los correspondientes plasmas en K_3EDTA. Los resultados se resumen en la Tabla 23.

Tabla 23. Concentración plasmática de Hcy en los Grupos Trombótico y Control.

	Grupo Trombótico		*Grupo Control*		
	n	*Hcy (μM)*	*N*	*Hcy (μM)*	*P*
Total	118	16,4 ± 8,1	115	12,8 ± 3,4	< 0.001
Mujeres	60	14,0 ± 7,0	65	12,0 ± 3,5	0.08
Hombres	58	19,0 ± 8,5	50	14,0 ± 2,8	0.001

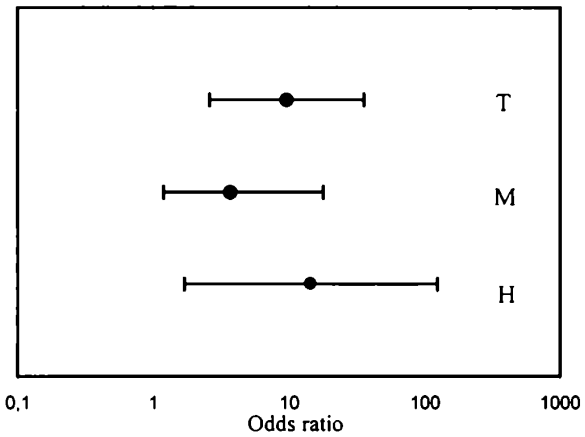
Los resultados están expresados como media ± DE (desvío estándar).
La comparación estadística se realizó con el *test* de z.

Como los resultados del *Grupo Control* mostraron distribución normal:

$$\text{Valor de corte} = \overline{X} + 1{,}96\ DE$$

$\overline{X}$: Promedio
DE: Desvío estándar

Por lo tanto, los valores resultaron 19,4 μM; 18,9 μM y 19,6 μM, para la población *Total, Mujeres* y *Hombres*, respectivamente. Teniendo en cuenta estos resultados, se calcularon los *odds ratios* (OR) respectivos (Figura 19).



	Valor de corte Hcy	*OR*
Total	19,4 μM	9,5
Mujeres	18,9 μM	3,7
Hombres	19,6 μM	14,5

Figura 19. *Odds ratios* e $IC_{95\%}$ en el *Grupo Trombótico* para la población Total (T), Mujeres (M) y Hombres (H), según el valor de corte correspondiente. Escala logarítmica.

Se observa que el riesgo de TV asociado a estos valores de corte es muy elevado y que además, el sexo es modificador del efecto. Sin embargo, este riesgo podría estar relacionado no sólo a la acción de la hiperhomocisteinemia sino a la presencia de otros factores de riesgo trombóticos tales como: deficiencias de proteína C (PC), proteína S

(PS), antitrombina III (ATIII); presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL); factor V Leiden (FVL) y/o protrombina 20210 (P_{20210}). Por lo tanto, en un análisis posterior se evaluaron estos parámetros, excluyéndose 36 pacientes que presentaron uno o más factores de riesgo (8 deficitarios de PS; 8 con aFL; 10 heterocigotas FVL, 2 homocigotas FVL; 4 heterocigotas P_{20210} y 4 doble heterocigotas FVL + P_{20210}). Esta selección dio como resultado un *Grupo Trombótico Final* con las siguientes características:

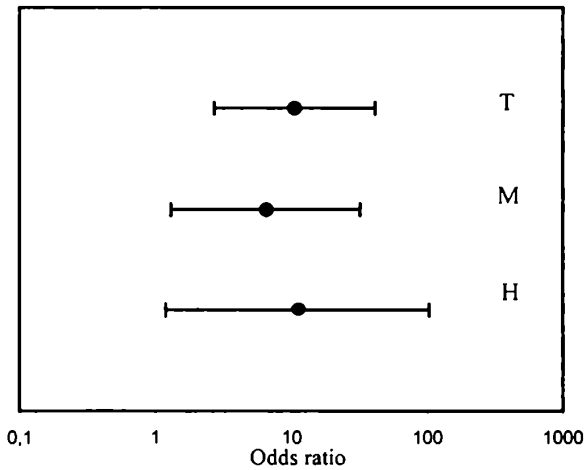
Grupo Trombótico Final (GTF): 82 pacientes (38 M/44H).
Edad (mediana y rango) = 39 años (25 – 58 años).

En este grupo los valores de homocisteinemia, expresados como mediana y rango, resultaron:

Hcy_{Total} (n = 82) = 16,4 ± 8,1 μM
$Hcy_{Mujeres}$ (n = 38) = 14,4 ± 8,3 μM
$Hcy_{Hombres}$ (n = 44) = 18,1 ± 7,7 μM

Los niveles de Hcy en el *GTF* no mostraron diferencias significativas (*Test* de Mann-Whitney) con los correspondientes al *GT* mostrados en la Tabla 23.

Considerando los mismos valores de corte utilizados para *GT* (ya que el *GC* no varió), se calcularon los *odds ratios* para *GTF* (Figura 20).



	Valor de corte Hcy	*OR*
Total	19,4 µM	10,5
Mujeres	18,9 µM	6,5
Hombres	19,6 µM	11,2

Figura 20. *Odds ratios* e $IC_{95\%}$ en el *Grupo Trombótico Final* para la población Total (T), Mujeres (M) y Hombres (H), según el valor de corte correspondiente. Escala logarítmica.

Los valores de los OR sugieren que niveles de Hcy superiores a: [$\overline{X}$ + 1,96 DE], se asocian con un riesgo elevado de sufrir trombosis venosa. Este hecho planteó la necesidad de proponer otros valores de corte. Se eligieron arbitrariamente 15 µM, 12 µM y 10 µM. Los resultados se muestran en la Tabla 24 y Figura 21.

Tabla 24. *Odds ratios* e $IC_{95\%}$ calculados para distintos valores de corte en el *Grupo Trombótico Final.*

	Odds ratio ($IC_{95\%}$)		
	Total	*Mujeres*	*Hombres*
> $\overline{X}$ + *1,96 DE*	10,5 (2,7 – 41,1)	6,5 (1,3 – 32,1)	11,2 (1,2 – 103,1)
> *15 µM*	2,7 (1,3 – 5,7)	1,9 (1,1 – 5,8)	2,8 (1,0 – 8,3)
> *12 µM*	2,4 (1,1 – 5,0)	2,1 (0,9 – 5,8)	2,4 (1,0 – 6,3)
> *10 µM*	1,2 (0,5 – 3,1)	0,8 (0,3 – 2,3)	1,8 (0,2 – 7,9)

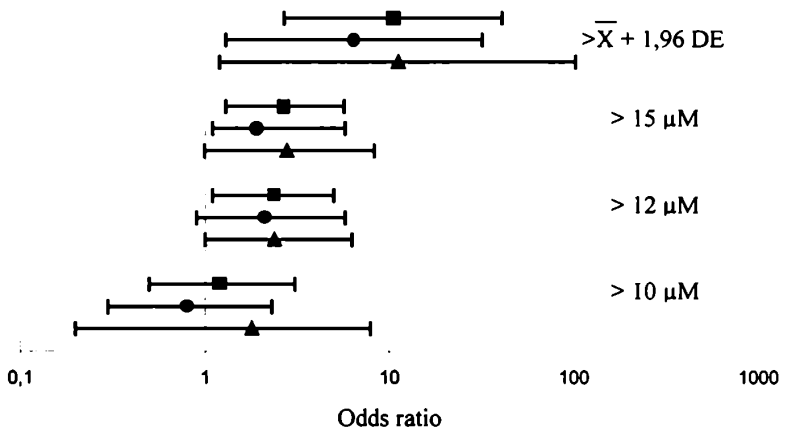


Figura 21. *Odds ratios* e $IC_{95\%}$ en el *Grupo Trombótico Final* para la población Total (■), Mujeres (●) y Hombres (▲). Evaluación de diferentes valores de corte. Escala logarítmica.

Según los datos mostrados en la Tabla 24, se observa que para Hcy > 12 µM los OR son significativamente mayores a 1, mientras que para Hcy > 10 µM, los OR no son significativamente distintos de 1. Por lo tanto, se analizaron valores de corte intermedios entre 10 µM y 12 µM

En la Tabla 25 y Figura 22 se muestran los OR de la población total para los siguientes valores de corte: 12,0 - 11,5 - 11,0 - 10,5 - 10,0 µM.

Tabla 25. *Odds ratios* e $IC_{95\%}$ en el *GTF* para la población total.

	Valor de corte (µM)				
	> 12,0	*>11,5*	*> 11,0*	*>10,5*	*>10,0*
Odds ratio	2,4	1,7	1,9	1,3	1,2
($IC_{95\%}$)	(1,1 – 5,0)	(0,8 – 3,6)	(0,8 – 4,5)	(0,6 – 3,2)	(0,5 – 3,1)

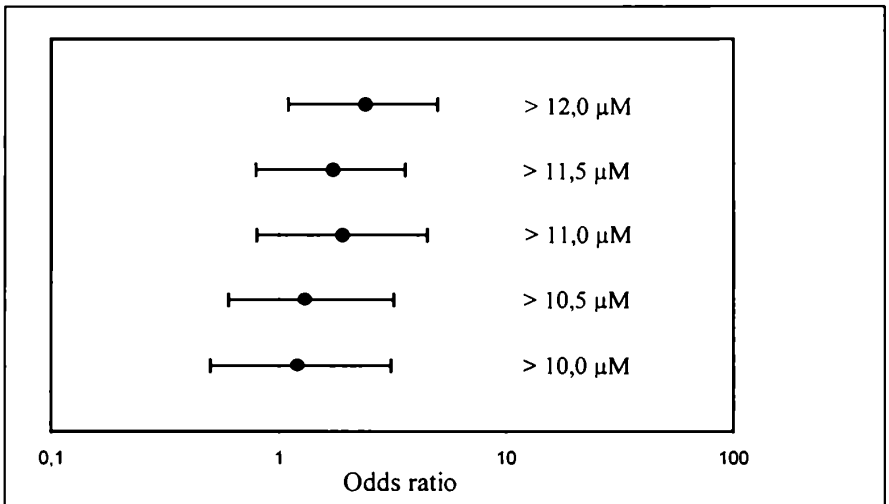


Figura 22. *Odds ratios* e $IC_{95\%}$ en el *Grupo Trombótico Final* para la población Total. Evaluación de valores de corte entre 10 y 12 µM. Escala logarítmica.

DISCUSIÓN

Aún no hay consenso internacional respecto al rango de referencia para homocisteinemia, observándose diferentes valores según el estudio considerado. Esta variabilidad se explicaría fundamentalmente por las diferencias en las poblaciones evaluadas, tamaño y procesamiento de las muestras y en las metodologías utilizadas. Además, individuos sanos (requisito indispensable para ser incluido en un estudio de referencia) pueden presentar deficiencias subclínicas de vitamina B_{12} y ácido fólico, que conducen a niveles de Hcy aumentados. Por lo tanto, el valor de corte para homocisteinemia establecido a partir del rango de referencia estaría afectado, entre otras, por las variables enunciadas.

Por otra parte, considerando que una concentración plasmática de Hcy mayor al límite superior del intervalo de referencia no refleja la presencia de una patología sino un riesgo asociado a la misma, sería conveniente establecer el valor de corte en un análisis

que evalúe la asociación entre los niveles de Hcy y la presencia de la patología. En esta tesis ya se ha comentado las innumerables evidencias clínicas que relacionan la hiperhomocisteinemia con la enfermedad vascular oclusiva; en particular en el área de hemostasia es importante la relación con la trombosis venosa.

Se determinó la concentración de Hcy plasmática en pacientes que hubiesen sufrido episodios trombóticos venosos recientes (*GrupoTrombótico*, *GT*) y en individuos aparentemente sanos (*Grupo Control*, *GC*).

A partir del GC, el valor de corte para la población en general, resultó igual a 19,4 μM; si se divide por sexos, los valores de corte para mujeres y hombres fueron 18,9 y 19,6 μM respectivamente. Con estos datos se estimó el riesgo asociado a trombosis mediante el cálculo de *odds ratios*. La Figura 19 muestra que la probabilidad de sufrir eventos trombóticos a partir de niveles plasmáticos de Hcy mayores a 19,4 μM (para la población total) es muy elevada, siendo mucho mayor en los hombres que en las mujeres (considerando los respectivos valores de corte).

Teniendo en cuenta que la trombosis es una enfermedad que resulta de la interacción entre factores genéticos y adquiridos, se realizó un análisis posterior más riguroso. Se excluyeron del estudio a los pacientes portadores de factores de riesgo establecidos para la trombosis venosa tales como deficiencias de proteína C, proteína S, antitrombina; presencia de anticuerpos antifosfolípidos, factor V Leiden y/o protrombina 20210. Se obtuvo un *Grupo Trombótico Final* (*GTF*), con valores de Hcy similares al *GT* inicial.

En el *GTF* los valores de los *odds ratios* (*OR*) para la población total y para las mujeres resultaron aún más altos que en el *GT*, observándose que también en el *GTF*, el *OR* fue mayor en los hombres (Figura 20). Estudios internacionales han reportado que los individuos con concentración de Hcy mayores a 18,5 μM mostraron un riesgo de trombosis venosa 2,5 veces mayor que los sujetos con niveles de Hcy por debajo de ese valor; mientras que por encima de 20 μM el riesgo se incrementó 3 a 4 veces[105,179].

Con el fin de determinar un valor de homocisteinemia por debajo del cual no se observe riesgo asociado a la trombosis venosa, se calcularon los *OR* para valores de corte

menores a los descriptos. Según se muestra en la Tabla 24 y Figura 21 se encontró que el riesgo de eventos trombóticos se incrementa notablemente a medida que aumenta el valor de corte y el valor óptimo estaría comprendido entre 10 y 12 μM. El análisis de valores intermedios (Figura 22) confirmó que sólo el nivel de corte en 12 μM mostró límites del $IC_{95\%}$ estadísticamente significativos.

A pesar de que aún no está claramente establecido el nivel mínimo de Hcy plasmática que no se asocia con riesgo aterotrombótico, varios trabajos internacionales han propuesto valores normales menores al utilizado corrientemente (15 μM). Entre los estudios más relevantes pueden mencionarse al NHANES III, los trabajos de Ubbink *et al.* y Rasmussen *et al.* (comentados en pág. 106-108). También se ha propuesto que para niveles de Hcy mayores a 12,5 μM, o aún mayores a 10 μM, se observa una fuerte asociación con la enfermedad vascular a nivel arterial[66,83,88,180].

Por lo tanto podría postularse que los niveles elevados de homocisteína plasmática constituyen un factor de riesgo independiente para la trombosis venosa. El sexo resultó modificador del efecto y en particular el riesgo trombótico asociado a la hiperhomocisteinemia fue mucho mayor en los hombres que en las mujeres. Se propone un valor de corte para la concentración plasmática de homocisteína para ambos sexos igual a 12 μM.

RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DE LA MTHFR Y EL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA

Se seleccionaron pacientes con episodios de trombosis venosa a edad temprana, en lugares inusuales o con recurrencia del episodio trombótico. Se excluyeron aquellos sujetos con factores de riesgo trombótico establecidos: deficiencias de antitrombina, proteína C, proteína S; presencia de anticuerpos antifosfolípidos; factor V Leiden, protrombina 20210 y patologías asociadas a la trombosis.

Se evaluaron 82 pacientes no relacionados (*Grupo Tr*): 44 mujeres y 38 hombres. La edad expresada como mediana y rango fue 39 años (25-58 años).

Como grupo control se estudiaron 50 individuos sanos no relacionados (*Grupo C*), con distribución etárea y de sexo similares a la del *Grupo Tr*.

De cada individuo se obtuvieron muestras de sangre entera anticoagulada con K_3EDTA y se determinó el genotipo para la variante termolábil de la MTHFR (C677T).

Con los resultados obtenidos por biología molecular se calculó, en los dos grupos estudiados, la proporción de individuos normales, heterocigotas y homocigotas para la variante termolábil de la MTHFR. No se observaron diferencias significativas (*test* χ^2) en la distribución genotípica entre los dos grupos (Tabla 26).

Tabla 26. Proporción (%) de individuos normales, heterocigotas y homocigotas en los grupos Trombótico y Control.

	Normal (C677C)	*Heterocigota (C677T)*	*Homocigota (T677T)*
Grupo Trombótico (n = 82)	22,0 %	58,5 %	19,5 %
Grupo Control (n = 50)	38,0 %	42,0 %	20,0 %

Se calculó también, la frecuencia del alelo T en las dos poblaciones. Este análisis mostró los siguientes resultados:

Grupo Trombótico: 48,8 % (IC $_{95\%}$ 41,2 – 56,4 %).

Grupo Control: 41,0 % (IC $_{95\%}$ 31,7 – 50,8 %).

La distribución alélica tampoco mostró diferencias significativas entre los dos grupos (*Test* asintótico para proporciones).

Considerando que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para la trombosis venosa, en un análisis posterior se excluyeron aquellos individuos con niveles de Hcy >15 μM (valor de corte tradicional). En este subgrupo tampoco se encontraron diferencias significativas para la distribución genotípica, ni para la frecuencia del alelo T entre los grupos *Control* (n = 43) y *Trombótico* (n = 42).

DISCUSIÓN

En esta tesis se ha demostrado que la presencia del alelo T en la posición 677 del gen de la MTHFR en homocigosis se asocia a niveles de Hcy mayores respecto a los portadores heterocigotas (CT) y normales (CC). Por otra parte, se postuló que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para la trombosis venosa. Se planteó entonces si la variante termolábil de la MTHFR sería un factor de riesgo trombótico. Con este objetivo se realizó el estudio genotípico de individuos que presentaron episodios de trombosis venosa (Grupo Trombótico) y de sujetos aparentemente sanos (Grupo Control), con distribución etárea y de sexo similares a la del Grupo Trombótico. En ningún caso se incluyeron individuos con relación de parentesco.

Los valores de la distribución genotípica y de la frecuencia del alelo T no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos. Estos resultados sugieren que la presencia de la variante termolábil de la MTHFR (aún en portadores homocigotas) no estaría relacionada con el riesgo de trombosis venosa.

Si bien en el Grupo Trombótico no fueron evaluados pacientes con factores de riesgo establecidos, el criterio de inclusión fue independiente de los niveles de Hcy. Sin embargo, según lo demostrado, los episodios trombóticos de los sujetos evaluados podrían estar asociados a hiperhomocisteinemia. En una selección más rigurosa de la población se excluyeron a los pacientes con niveles de Hcy mayor a 15 μM. En este nuevo análisis los resultados de la distribución genotípica y de la frecuencia del alelo T confirmaron la ausencia de asociación entre la MTHFR y la trombosis venosa.

A nivel internacional los reportes son contradictorios. Algunos trabajos proponen al genotipo homocigota para la variante termolábil como factor de riesgo independiente para la enfermedad aterotrombótica[181,182], mientras que otros concluyen que si bien la mutación C677T/MTFHR es causa de hiperhomocisteinemia leve, no incrementa el riesgo trombótico[183,184,185] o lo aumenta débilmente[186].

En el presente estudio la presencia de la variante termolábil de la MTHFR no resultó factor de riesgo para la trombosis venosa.

HOMOCISTEÍNA Y HEMOSTASIA

Si bien existen numerosas evidencias clínicas que relacionan los niveles elevados de homocisteína con los episodios trombóticos, aún no están esclarecidos los mecanismos fisiopatológicos involucrados en esta asociación. Con el fin de dilucidar la acción perjudicial de la homocisteína se investigó el efecto del aminoácido sobre componentes del sistema hemostático en modelos experimentales *in vitro* y *ex vivo*. Por otra parte, se evaluaron los niveles de factor von Willebrand y dermatán sulfato en hiperhomocisteinemia, como posibles parámetros asociados al deterioro vascular.

ACCIÓN DE LA HOMOCISTEÍNA SOBRE COMPONENTES DEL SISTEMA HEMOSTÁTICO

Con el fin de evaluar el efecto de la Hcy sobre el sistema hemostático se analizaron: la agregación plaquetaria, la actividad de los factores del sistema de coagulación y la fibrinolisis, en presencia de concentraciones elevadas de homocisteína.

La mayoría de los trabajos *in vitro* que han estudiado el efecto de la Hcy en distintos sistemas, han utilizado concentraciones del aminoácido excesivamente altas (entre 1 y 10 mM). Este hecho, habitualmente es motivo de crítica de los resultados reportados. En esta tesis, uno de los objetivos de las experiencias *in vitro* fue utilizar concentraciones elevadas de Hcy pero posibles de detectar *ex vivo*, al menos en algunos individuos (Ej: en pacientes homocistinúricos los niveles de Hcy pueden llegar a 0,4 - 0,5 mM).

Luego de ensayar la solubilidad y estabilidad de diversas soluciones de Hcy, se eligió la concentración de la solución de trabajo = 3 mM y la concentración de la solución final = 0,3 mM.

PLAQUETAS

Se estudió la acción de la homocisteína sobre la agregación plaquetaria, evaluando *in vitro,* el efecto sobre las plaquetas y los inductores. Con este objetivo se incubaron separadamente ambos componentes con solución de Hcy.

Muestras

A partir de un *pool* de plasmas rico en plaquetas (PRP) e inductores de agregación (trombina, ADP, colágeno) se prepararon muestras modificadas *in vitro* por el agregado de una solución de Hcy (3 mM). Los controles correspondientes se obtuvieron reemplazando la solución de homocisteína por solución fisiológica. Las proporciones y condiciones ensayadas se indican a continuación:

PRP – Hcy

	Tiempos de incubación (a 37 °C)		
a) 900 µl PRP + 100 µl Hcy	0 min	30 min	60 min
a') 900 µl PRP + 100 µl SF	"	"	"

Inductor (Trombina, ADP, Colágeno) – Hcy

	Tiempos de incubación (a 37 °C)	
b) 200 µl Inductor + 100 µl Hcy	0 min	60 min
b') 200 µl Inductor + 100 µl SF	"	"
c) 150 µl Inductor + 150 µl Hcy	0 min	60 min
c') 150 µl Inductor + 150 µl SF	"	"
d) 100 µl Inductor + 200 µl Hcy	0 min	60 min
d') 100 µl Inductor + 200 µl SF	"	"

Agregación plaquetaria

La valoración de la respuesta de agregación de las plaquetas se realizó por el agregado de 50 µl del inductor a 450 µl de la solución PRP, registrándose la densidad óptica (DO) en función del tiempo. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los inductores ensayados fueron trombina, ADP y colágeno, con concentraciones descriptas en la sección *Materiales y Métodos*.

La comparación de las curvas obtenidas para cada una de las muestras respecto a sus controles mostró los siguientes resultados:

- Los plasmas incubados con Hcy a distintos tiempos *(a)* presentaron agregación normal con los tres inductores. En todos los casos, no se observaron diferencias en las curvas de agregación de las muestras con Hcy respecto a las de los controles con solución fisiológica.
- El PRP con los inductores trombina o ADP, incubados con Hcy según las condiciones *(b)*, *(c)* y *(d)*, mostró curvas de agregación semejantes a los controles.
- El PRP con colágeno incubado con Hcy según *(b)* y *(c)*, presentó agregación normal.
- Por el contrario, el PRP con colágeno incubado con Hcy, según *(d)*, presentó curvas de agregación con una amplitud 43 % menor respecto a las obtenidas con el control en las mismas condiciones. Esta disminución fue aún más significativa (73 %) cuando la prueba de agregación se realizó aumentando la proporción de colágeno respecto al plasma (120 µl colágeno + 380 µl PRP). Estos resultados se muestran en la Figura 23.

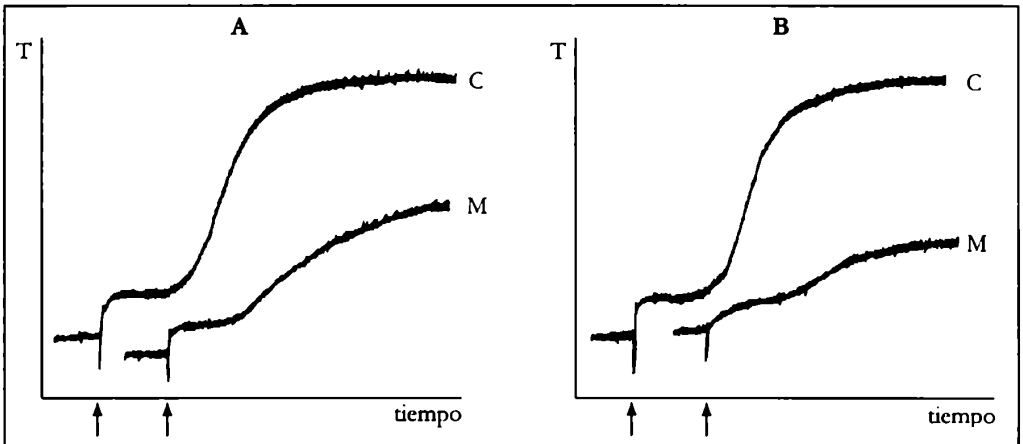


Figura 23. Curvas de agregación plaquetaria. T: transmitancia; C: curva control; M: curva de la muestra con Hcy. Las flechas indican el agregado de colágeno.
A: 50 µl colágeno+ 450 µl PRP; **B:** 120 µl colágeno+ 380 µl PRP.

FACTORES DE COAGULACIÓN

Se estudió el efecto de la homocisteína en dos sistemas experimentales: *in vitro* y *ex vivo*.

Sistema in vitro

A partir de un *pool* de plasmas normales citratados se prepararon muestras modificadas *in vitro* por el agregado de una solución de Hcy 3 mM en solución fisiológica (SF). Los controles correspondientes se obtuvieron reemplazando la solución de homocisteína por SF. Las proporciones y condiciones ensayadas se indican a continuación:

900 µl Plasma + 100 µl Hcy —Sin incubación→ M_1

900 µl Plasma + 100 µl SF —"→ C_1

900 µl Plasma + 100 µl Hcy —37 °C, 1 h→ M_2

900 µl Plasma + 100 µl SF —"→ C_2

Todas las muestras y controles se prepararon por triplicado. Las pruebas de coagulación se realizaron por duplicado con un coagulómetro semiautomático ST4 (Stago, Francia).

Se realizaron las pruebas globales (*TP:* Tiempo de Protrombina; *TTPA:* Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada y *TT:* Tiempo de Trombina). Además se determinaron los niveles de los factores de coagulación (*Fbg:* Fibrinógeno; *FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI* y *FXII*). En la Tabla 27 se muestran los resultados de cada tipo de muestra (*M*) y los controles respectivos (*C*).

Tabla 27. Parámetros del sistema de coagulación de muestras modificadas *in vitro*.

	M_1	C_1	M_2	C_2
T.P. (%)	95 (93 – 100)	98 (93 – 99)	92 (90 – 95)	94 (93 – 97)
A.P.T.T.(seg)	31,5 (29,0 – 35,5)	33,2 (31,0 – 35)	30,8 (28,2 – 32,1)	31,4 (28,0 – 33,0)
T.T. (seg)	18,0 (17,1 – 19,2)	18,5 (16,9 – 19.9)	17,8 (15,6 – 19,1)	18,5 (17,3 – 20,0)
Fbg (mg/dl)	250 (240 – 260)	255 (240 – 260)	245 (230 – 260)	240 (230 – 250)
FII (%)	102 (95 – 108)	108 (102 – 110)	98 (92 – 100)	95 (89 – 97)
FV (%)	73 (71 – 76)	75 (70 – 76)	60 (58 – 63)	58 (55 – 59)
FVII (%)	78 (75 – 80)	81 (75 – 82)	75 (72 – 80)	77 (75 – 79)
FVIII (%)	83 (80 – 84)	80 (78 – 81)	82 (77 – 85)	78 (75 – 83)
FIX (%)	92 (88 – 94)	90 (87 – 92)	88 (85 – 92)	86 (84 – 90)
FX (%)	93 (87 – 95)	90 (85 – 93)	88 (83 – 91)	86 (83 – 90)
FXI (%)	85 (80 – 89)	88 (84 – 92)	80 (75 – 84)	84 (79 – 86)
FXII (%)	102 (95 – 104)	105 (99 – 106)	98 (90 – 100)	102 (90 – 104)

Los datos están expresados como mediana y rango.

Se compararon los resultados de cada muestra tratada con Hcy, respecto a los obtenidos con los controles respectivos. El análisis estadístico (*test* de Mann-Whitney) no mostró diferencias significativas entre los mismos.

Sistema ex vivo

Durante un período de tres meses se recolectaron los plasmas en K_3EDTA y en citrato trisódico, de 72 individuos aparentemente sanos. Las muestras se conservaron a -70 °C hasta su procesamiento.

Se determinó la concentración de Hcy en todas las muestras (plasmas en EDTA). Se encontró que 16/72 correspondían a sujetos con hiperhomocisteinemia. Se seleccionaron las muestras en citrato de estos 16 individuos (*Grupo H: Hiperhomocisteinémicos*) y de 16 sujetos con Hcy baja (*Grupo C: Control*). Las muestras del *Grupo C* correspondieron a los mismos días de extracción de las del *Grupo H.*

Los grupos presentaron las siguientes características (expresadas como mediana y rango):

Grupo H: 9 M/7H; edad = 42 años (35 – 59 años); Hcy = 24,6 μM (16,2 – 38 μM).

Grupo C: 8 M/8H; edad = 37 años (24 – 52 años); Hcy = 9,5 μM (7,1 – 11,2 μM).

Los niveles de Hcy en el *Grupo H* fueron significativamente más altos que en el *Grupo C* (p = 0,01; *test* de Mann-Whiney).

Se determinaron las pruebas globales y los factores de coagulación en plasmas citratados seleccionados. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Parámetros de coagulación en los grupos de individuos hiperhomociteinémicos *(H)* y control *(C)*.

	Grupo H *(n =16)*	*Grupo C* *(n =16)*
T.P. (%)	95 (88 – 100)	99 (95 – 100)
A.P.T.T.(seg)	34,2 (28,0 – 37,4)	32,5 (29,0 – 39,5)
T.T. (seg)	20,5 (15,5 – 23,2)	19,8 (16.3 – 22,1)
Fbg (mg/dl)	315 (195 – 388)	278 (270 – 355)
FII (%)	95 (75 – 103)	101 (85 – 105)
FV (%)	79 (58 – 88)	85 (60 – 98)
FVII (%)	81 (67 – 92)	89 (65 – 100)
FVIII (%)	90 (53 – 105)	94 (60 – 102)
FIX (%)	82 (77 – 100)	90 (83 - 109)
FX (%)	99 (80 – 105)	95 (85 – 100)
FXI (%)	82 (67 – 98)	87 (73 – 98)
FXII (%)	97 (65 – 102)	103 (84 – 110)

Los datos se expresan como mediana y rango.

Los parámetros evaluados no mostraron diferencias significativas entre los grupos entre los dos grupos (*test* de Mann-Whitney).

FIBRINOLISIS

Se evaluó el efecto de la homocisteína sobre pruebas globales de la fibrinolisis.

Tiempo de lisis de sangre entera diluida

Para la evaluación de esta prueba, en el sistema de reacción se incorporó solución de Hcy 3 mM, en una proporción cuya concentración final resultara = 0,3 mM. El control correspondiente se obtuvo reemplazando la solución de homocisteína por solución fisiológica (SF). Las proporciones y condiciones ensayadas se indican a continuación:

200 µl sangre + 1.500 µl *buffer* + 200 µl Hcy ⟶ M_3

200 µl sangre + 1.500 µl *buffer* + 200 µl SF ⟶ C_3

La muestra y el control se prepararon por triplicado. A cada sistema se agregaron 100 µl de trombina y se procedió según la técnica. La disolución total de los coágulos se observó a las 22hs 33min y a las 22hs 08min para *M3* y *C3* respectivamente (los resultados expresan el promedio del ensayo realizado por triplicado). La diferencia entre el tiempo de lisis de la muestra y del control no resultó estadísticamente significativa.

Tiempo de lisis de euglobulinas

La precipitación de la fracción euglobulínica se realizó a partir de un *pool* de plasmas normales citratados. Luego de descartar el sobrenadante, que contiene la mayor parte de los inhibidores del sistema fibrinolítico, se disolvió el precipitado con *buffer* borato, a 37 °C. A partir de esta solución se agregó Hcy en concentración final = 0,3 mM. Para el control se agregó SF:

500 µl solución euglobulínica + 55,5 µl Hcy ⟶ M_4

500 µl solución euglobulínica + 55,5 µl SF ⟶ C_4

La muestra y el control se prepararon por cuadruplicado. Se agregó la solución de $CaCl_2$, obteniéndose los coágulos correspondientes. Los tiempos de lisis de euglobulinas, expresados como mediana y rango, resultaron 192 (175 – 235) minutos y 195 (180 – 240) minutos, para M_4 y C_4 respectivamente. No se observaron diferencias significativas en los tiempos de lisis de la muestra tratada con Hcy respecto al control.

DISCUSIÓN

En esta sección de la tesis se estudió el efecto de altas concentraciones de Hcy sobre componentes del sistema hemostático, a través de pruebas de evaluación que se realizan en el laboratorio de hemostasia.

En los estudios de agregación plaquetaria se analizó separadamente la acción de la Hcy sobre los componentes principales de esta prueba: *plaquetas* e *inductores*.

Plaquetas. Los resultados obtenidos muestran que, en los sistemas *in vitro* ensayados (PRP – Hcy), las concentraciones de Hcy utilizadas no incrementaron la agregación de las plaquetas, sugiriendo que el aminoácido no modificaría las reacciones intracelulares involucradas en la unión plaqueta-plaqueta. Probablemente, no se modifica la actividad de la glicoproteína IIbIIIa (reguladora del proceso de agregación) ni de los ligandos intervinientes en la unión, como el fibrinógeno, la trombospondina y la fibronectina.

En la literatura se dispone de pocos reportes referidos a la agregación plaquetaria en hiperhomocisteinemia (HHcy). Coppola *et al.* [132] no encontraron diferencias significativas en los resultados de esta prueba (agonistas utilizados: ADP, ácido araquidónico y colágeno) entre individuos homocistinúricos y un grupo control. En modelos animales con HHcy inducida, Fuglsang *et al.* reportaron que la agregación con ADP resultó normal, mientras que con colágeno la respuesta disminuyó respecto al control[187]. En cambio, otros investigadores en modelos experimentales similares, observaron una potenciación de la agregación plaquetaria en respuesta al ADP y a la trombina[188].

Probablemente, las discrepancias en los resultados se deben a que la Hcy no aumenta la agregación plaquetaria *per se*, sino que de manera dosis-dependiente, induciría la adhesión de las plaquetas a las células endoteliales, como consecuencia de su efecto tóxico sobre el endotelio mismo.

Inductores. En estas experiencias se evaluó la agregación plaquetaria post-incubación de los distintos agonistas con Hcy. Se observaron respuestas similares a la de los controles cuando se utilizó ADP y trombina en todas las proporciones ensayadas. Igual resultado se obtuvo con colágeno incubado en las condiciones *(b)* y *(c)*. Sin embargo, cuando la relación "Hcy/Colágeno" utilizada fue mayor *(d)*, la agregación fue significativamente menor respecto al control (descenso de la amplitud de la curva = 43%). Además, cuando se aumentó la proporción "Colágeno$_{(d)}$/PRP" en la prueba de agregación, se registró un descenso aún más significativo en la amplitud de la curva (73%). Los resultados de las experiencias indican que la Hcy no modificaría la integridad metabólica de las plaquetas (evaluada por las pruebas de agregación) pero sí afectaría la estructura y/o funcionalidad del colágeno.

Existe poca información acerca de la posible acción de la Hcy sobre las fibras de colágeno. Estas fibras constituyen uno de los componentes del tejido conectivo que le confieren resistencia y flexibilidad. Se ha hipotetizado que las complicaciones oculares, óseas y vasculares observadas en pacientes homocistinúricos no tratados, se asociarían a un defecto en el entrecruzamiento de las fibras de colágeno, mediado por la Hcy[189]. Probablemente los grupos sulfhidrilos del aminoácido bloquearían a los grupos aldehídos del colágeno, los que le confieren funcionalidad a la proteína[190,191]. Este efecto de la Hcy sobre la integridad del tejido conectivo también estaría relacionado con desenlaces obstétricos adversos observados en mujeres hiperhomocisteinémicas embarazadas[192].

Si bien los resultados del presente estudio y las hipótesis enunciadas no muestran una relación directa de la Hcy sobre las plaquetas (uno de los objetivos de esta parte de la tesis), las observaciones respecto al colágeno plantean otros puntos de interés a investigar.

En la evaluación del efecto de la Hcy sobre los factores de coagulación se analizaron muestras plasmáticas modificadas *in vitro* y obtenidas de pacientes con HHcy. La ausencia de diferencias significativas en los resultados de las pruebas globales y dosaje de factores (Tabla 27 y 28) entre las muestras y los controles respectivos, sugieren que altas concentraciones de Hcy (tanto *in vitro* como *ex vivo*) no modificarían la actividad de los componentes evaluados.

Para el estudio de la relación de la Hcy con la fibrinolisis se realizaron las pruebas de lisis de sangre entera diluida y lisis de euglobulinas en presencia de Hcy. Los tiempos de lisis de los coágulos obtenidos a partir de sangre entera diluida resultaron similares en las muestras y en los controles, sugiriendo que la relación entre tPA-PAI (Activador tisular del plasminógeno-Inhibidor del activador del plasminógeno) se mantiene en equilibrio. En la prueba de lisis de euglobulinas también se registraron tiempos sin diferencias significativas entre las muestras tratadas con Hcy y sus controles. En esta técnica se eliminan del sistema los inhibidores de la fibrinolisis, por lo que de los resultados obtenidos podría inferirse que la Hcy no produciría modificaciones importantes en la actividad del t-PA (principal activador del sistema fibrinolítico).

Si bien se trata de pruebas globales de evaluación de la fibrinolisis, orientan acerca de ciertas alteraciones en el sistema total.

Sólo pocos estudios han investigado la relación directa entre la hiperhomocisteinemia y los sistemas de coagulación y fibrinolítico en humanos. Para los factores de coagulación se dispone de datos parciales y contradictorios, según el estudio analizado. Los trabajos de von Eckardtein *et al.* y de B.Kuch *et al.* demostraron una fuerte asociación entre la concentración plasmática de Hcy y los niveles de fibrinógeno[193,194], mientras que los estudios Framingham, ARIC y Caerphilly no encontraron dicha asociación[94,195,196]. No se conocen otras referencias relevantes que reporten los niveles de los factores de coagulación en hiperhomocisteinemia.

Respecto a la relación entre la concentración elevada de Hcy y los parámetros fibrinolíticos también existen controversias. Algunos investigadores observaron una

correlación significativa entre la homocisteinemia y los niveles antigénicos de t-PA[197] y PAI-1[198], en cambio M.Bozic *et al.* demostraron lo contrario[199].

En los estudios in vitro y ex vivo no se encontraron evidencias para asociar los niveles elevados de homocisteína con alteraciones en las plaquetas, los factores de coagulación y en la fibrinolisis. Un hallazgo significativo fue la modificación de la actividad agregante del colágeno, sugiriendo que altas concentraciones de Hcy podrían afectar la estructura de la proteína.

RELACIÓN DE LA HOMOCISTEINEMIA CON LOS NIVELES DE DERMATÁN SULFATO Y FACTOR VON WILLEBRAND

En base a experiencias previas en nuestro laboratorio, encontramos que los niveles plasmáticos de dermatán sulfato (DS) están aumentados en pacientes quemados, en enfermos renales (en hemodiálisis) y en pacientes sépticos. Estos hallazgos sugieren que una concentración elevada de DS en circulación, estaría asociada a la injuria endotelial.

Considerando que estudios experimentales *in vitro* postulan que una concentración elevada de Hcy induciría disrupción endotelial, se analizaron los niveles de dermatán sulfato y de factor von Willebrand en individuos con hiperhomocisteinemia.

Con este objetivo de evaluaron los plasmas obtenidos en citrato trisódico de 40 individuos con una edad de 75 años (66 a 83 años), expresada como mediana y rango. Se seleccionaron muestras de sujetos con niveles elevados de Hcy (*Grupo A* > 15 μM) y con niveles bajos de Hcy (*Grupo B* ≤ 15 μM).

En todas las muestras se determinaron las concentraciones de dermatán sulfato y de factor von Willebrand.

Los resultados para cada grupo se resumen en la Tabla 29.

Tabla 29. Niveles de Hcy, DS y FvW en individuos con hiperhomocisteinemia y en un grupo control.

	Grupo A (n = 20)	*Grupo B (n = 20)*	*p*
Homocisteína (μM)	22,0 (15,2 – 48,9)	12,6 (7,7 – 15,0)	< 0,0001
Dermatán sulfato (μg/ml)	1,75 (0,00 – 3,00)	0,85 (0,00 – 3,00)	0,05
Factor von Willebrand (%)	328 (162 – 368)	200 (150 – 305)	0,01

Grupo A: Hcy > 15 μM; *Grupo B:* Hcy ≤ 15 μM.
Valores expresados como mediana y rango. Test estadístico: Mann-Whitney.

DISCUSIÓN

El endotelio, superficie interna del sistema vascular, desempeña un rol activo en la regulación de la hemostasia y del tono y permeabilidad de los vasos sanguíneos. El endotelio está constituido por una monocapa de células endoteliales que controla el intercambio de distintos componentes con la matriz extracelular. En estado basal o *quiescente* se expresan y desarrollan su acción la mayoría de las sustancias con actividad antitrombótica, mientras que cuando el endotelio se activa por injuria mecánica o estímulos inflamatorios se liberan fundamentalmente sustancias protrombóticas. Por lo tanto, una alteración del endotelio puede producir desequilibrios en su entorno y contribuir al desarrollo de procesos aterotrombóticos[200].

En la *Introducción* de esta tesis se han comentado los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la acción tóxica de la Hcy sobre el endotelio. Se postula que una concentración elevada de Hcy provoca disfunción e injuria endotelial mediante un efecto directo o a través de la generación de otras moléculas. Estos hallazgos se observaron en experiencias con cultivos celulares, pero aún no hay resultados concluyentes de la acción de la Hcy sobre la función vascular *in vivo*.

Existen pocos estudios que hayan evaluado los niveles de marcadores de daño endotelial en hiperhomocisteinemia. Entre ellos se ha descripto aumento en la concentración de trombomodulina soluble[201] y de factor von Willebrand (FvW)[202] en individuos hiperhomocisteinémicos. En particular, van den Berg *et al.* encontraron que cuando disminuyeron los niveles plasmáticos de Hcy post-tratamiento vitamínico, también descendieron aquellos marcadores[203].

El DS es un glicosaminoglicano (GAG) natural sintetizado en los fibroblastos del subendotelio. En sujetos normales no se detectan niveles de DS en circulación, por lo que la presencia de este GAG sugiere alguna alteración vascular.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, se encontró que en pacientes con alteraciones del sistema vascular (sépticos, quemados y enfermos renales crónicos) los niveles plasmáticos de dermatán sulfato (DS) resultaron significativamente aumentados

respecto a controles sanos. Con estos antecedentes se evaluaron las concentraciones de DS y de FvW en un grupo de individuos con hiperhomocisteinemia.

El valor de la mediana de DS y de FvW determinados en el grupo control (*Grupo B*) resultaron mayores a los valores de referencia (DS=no detectable; FvW=60 - 150 %). Probablemente, los resultados se expliquen por la edad avanzada de los individuos evaluados. En el grupo con HHcy (*Grupo A*) los parámetros analizados fueron aún más elevados, resultando significativamente mayores que en los controles.

Como respuesta a la injuria vascular se desencadenan complejos mecanismos celulares y moleculares tales como formación del trombo, proliferación y muerte celular, procesos inflamatorios, modificación de la matriz extracelular, remodelación vascular, etc. Estudios recientes han encontrado un importante rol del DS en relación al daño tisular; este GAG, liberado durante la injuria, parece estar involucrado en un camino de señalización celular importante para la inflamación y en la reparación tisular[204].

Por lo tanto, los niveles de DS y FvW detectados en los individuos con HHcy podrían estar asociados al deterioro vascular que presumiblemente presentan los sujetos evaluados.

Si bien no se ha establecido que el dermatán sulfato es un marcador de disfunción endotelial, los resultados obtenidos plantean esta posibilidad.

ACCIÓN DE LA HOMOCISTEÍNA EN LA FORMACIÓN DE LA RED DE FIBRINA

A nivel internacional se han realizado numerosas experiencias *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales con el fin de interpretar la relación entre hiperhomocisteinemia y trombosis. La mayoría de los estudios que pretenden interpretar esta asociación están basados en el daño endotelial y los eventos sucesivos previos a la generación del trombo. Sin embargo, los mecanismos involucrados aún no han sido completamente esclarecidos.

Con el fin de dilucidar posibles mecanismos que contribuyan a la acción protrombótica de la Hcy se evaluó su efecto en la formación y estructura de la red de fibrina.

FIBRINOFORMACIÓN

Se evaluó el efecto de la homocisteína en la fibrinoformación y se comparó con la acción de otros compuestos azufrados, en las mismas condiciones experimentales. .

Se incubaron a 37 °C durante 1 hora, alícuotas de un *pool* de plasmas normales citratados con soluciones recién preparadas de: homocisteína, cisteína y homocistina, en concentración final (c.f.) = 0,3 mM. La muestra control se obtuvo reemplazando los compuestos azufrados por *buffer* PBS.

A cada una de las muestras plasmáticas modificadas se agregó trombina bovina (c.f.= 0,05 U/ml) y $CaCl_2$ (c.f. = 33 mM), obteniéndose los coágulos correspondientes. Los ensayos se realizaron por triplicado, en policubetas de poliestireno. La fibrinoformación y la estructura de las redes de fibrinas obtenidas se evaluaron mediante estudios cinéticos y microscopía electrónica de barrido (M.E.B.).

- ***Cinética de la fibrinoformación***

Durante el proceso de coagulación de cada uno de los plasmas ensayados, se registró la densidad óptica (DO) a 450 nm en función del tiempo hasta valor constante (Fig. 24).

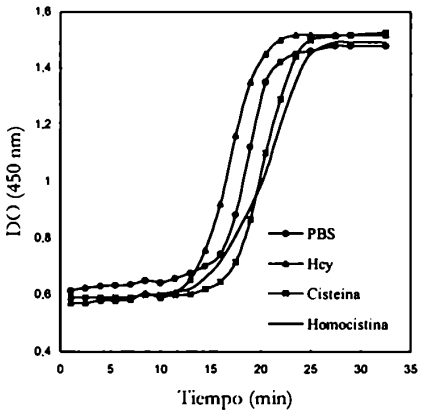


Figura 24. Efecto de los compuestos azufrados sobre la fibrinoformación. Las curvas representan el promedio de las DO (n = 3) *vs.* el tiempo.

Las curvas sigmoideas obtenidas fueron caracterizadas por tres parámetros: *fase lag*, (tiempo de inicio de la coagulación), *pendiente* (velocidad de fibrinoformación) y *DO máxima* (Tabla 30).

Tabla 30. Parámetros de la cinética de la fibrinoformación.

	Fase lag (min)	*Pendiente (min^{-1})*	*$DO_{máxima}$*
Control (PBS)	15,6 ± 1,4	0,140 ± 0,079	1,478 ± 0,024
Homocisteína	14,3 ± 1,3	0,132 ± 0,019	1,517 ± 0,023
Cisteína	16,6 ± 0,7	0,132 ± 0,028	1,527 ± 0,025
Homocistina	15,3 ± 0,6	0,118 ± 0,026	1,491 ± 0,028

Los resultados se expresan como media ± DE.

Para los tres parámetros estudiados no se observaron diferencias significativas entre cada una de las sustancias ensayadas respecto al control (*test* de Student).

- ***Estructura de las redes de fibrina***

Las redes obtenidas en los diferentes ensayos se observaron con un microscopio electrónico de barrido (MEB) y se obtuvieron las fotografías correspondientes a 3.000 aumentos (Lámina II). Para la caracterización de las redes, las fotos se evaluaron con un sistema analizador de imágenes, determinando el número de fibras por campo, el porcen-taje de red, el ancho y largo de las fibras. Se evaluaron 12 campos de igual área, aleatoriamente seleccionados (Tabla 31).

Tabla 31. Caracterización de las redes de fibrina.

	N° Fibras/campo (n = 12)	*% Red* (n = 12)	*Ancho de fibra (µm)* (n = 180)	*Largo de fibra (µm)* (n = 180)
Control PBS	30 (27 - 32)	62 (56 - 70)	0,31 (0,17-0,41)	1,02 (0,56-2,31)
Homocisteína	36 (32 – 38) p = 0,01	76 (73 - 77) p = 0,05	0,33 (0,18 – 0,69) p = 0,04	0,56 (0,23 - 1,89) p = 0,001
Cisteína	31 (21 – 35) NS	65 (42 - 70) NS	0,36 (0,20 – 0,84) p = 0,02	0,83 (0,38 - 1,96) p = 0,001
Homocistina	31 (27 - 33) NS	65 (57 – 70) NS	0,31 (0,18 - 0,61) NS	0,92 (0,46 – 2,55) NS

% Red: (Área total de las fibras/Área total del campo) x 100.
Los parámetros están expresados como mediana y rango. La comparación estadística se realizó con el *test* de Mann-Whitney. NS: diferencias no significativas.

Con Hcy se obtuvieron redes de fibrina con un número de fibras por campo y porcentaje de red estadísticamente más altos que el control. Además, las fibras resultaron más gruesas y cortas. De esta manera, las redes observadas presentaron una arquitectura más densa y con más ramificaciones que el control.

En presencia de cisteína se formaron redes cuyo número de fibras por campo y porcentaje de red fueron similares al control, aunque las fibras resultaron significativamente más gruesas y cortas.

Con homocistina no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros que caracterizan la red.

DISCUSIÓN

Los mecanismos que pretenden explicar la asociación entre la hiperhomocisteinemia y la enfermedad vascular oclusiva no están totalmente esclarecidos. Se postula que la Hcy reducida afectaría el balance normal del endotelio, generando un microambiente protrombótico[121]. Este efecto se ejercería por la acción directa de la Hcy sobre proteínas intra y extracelulares o indirectamente mediante las especies oxigenadas altamente reactivas que se generan durante la auto-oxidación de la Hcy. Los trabajos publicados intentan explicar el efecto trombogénico de la Hcy a partir del daño endotelial y de los procesos previos relacionados a la generación del trombo. Sin embargo aún no se han reportado las consecuencias que la presencia de altos niveles de Hcy tendría sobre las características del trombo. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó las características del coágulo plasmático obtenido en presencia del aminoácido y de otros compuestos azufrados.

La Figura 24 y la Tabla 30 muestran los resultados de la cinética de la fibrinoformación. No se observaron diferencias significativas en los parámetros registrados para cada una de las curvas *vs.* el control. Este hecho sugiere que las distintas sustancias ensayadas no afectarían a las velocidades de liberación de los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno ni a la polimerización de los monómeros de fibrina. Además, la ausencia de diferencias en las propiedades ópticas de los geles de fibrina hidratados indicaría similitud entre las estructuras obtenidas. Sin embargo, la microscopía electrónica de las redes de fibrina reveló diferencias importantes entre las redes, lo que

propone que la mera comparación de DO no sería suficiente para detectar cambios estructurales.

La Lámina II y Tabla 31 muestran que la red obtenida con Hcy posee una estructura más compacta, con fibras significativamente más gruesas y cortas que las del control. Weisel *et al.* han demostrado que la velocidad de fibrinolisis es fuertemente dependiente del tamaño y de la arquitectura de la red[149]. La plasmina corta transversalmente a las fibras individuales, lo que explicaría que las fibras gruesas sean más lentamente lisadas que las fibras delgadas. Además, las tramas cerradas, con más ramificaciones, son digeridas con más dificultad que las estructuras abiertas, ya que hay más fibras por unidad de volumen para cortar, disminuyendo la difusión de los componentes del sistema fibrinolítico. Por lo tanto, estas redes ofrecerían mayor resistencia a la lisis.

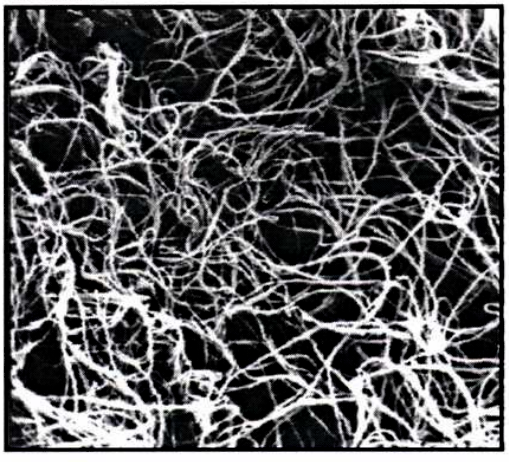
Numerosos estudios demostraron que la acción perjudicial de la Hcy estaría mediada por el grupo *tiol*. La Hcy sería oxidada a disulfuro por sustancias con *-SH*, tales como la misma Hcy, la cisteína, glutatión o diferentes proteínas. Además, la Hcy también podría intervenir en reacciones de intercambio de uniones disulfuros[10]. Con el fin de dilucidar si el grupo *tiol* está efectivamente involucrado en los resultados obtenidos, se analizó el efecto de otros compuestos azufrados, tales como homocistina y cisteína.

Analizando la Lámina II y la Tabla 31, surge que sólo la red de fibrina obtenida en presencia de homocistina es semejante a la del control. La homocistina es el dímero de la Hcy (Hcy-S-S-Hcy) y por lo tanto no presenta el grupo *tiol* libre en su molécula. Por otra parte, la incubación con cisteína generó una red con fibras más gruesas y cortas que el control, aunque la trama de la red (N° fibras/campo) no mostró diferencias estadísticamente significativas. Los cambios sólo parciales, observados con cisteína sugieren que la reactividad de este aminoácido sería de menor magnitud que la asociada a la Hcy. Además, esta observación estaría apoyada por el hecho de que existen muy pocos reportes que evidencian una acción aterogénica de la cisteína, a pesar de que su concentración plasmática es 20-30 veces mayor que la de Hcy[123].

Las modificaciones observadas con Hcy y con cisteína, pero no con homocistina sugieren que el grupo *–SH* estaría involucrado en esos cambios. Sin embargo, en concordancia con otros reportes internacionales, aún no se puede esclarecer si se trata de un efecto del grupo *tiol* específico de la Hcy o si es un efecto de ese grupo presente en otros compuestos azufrados.

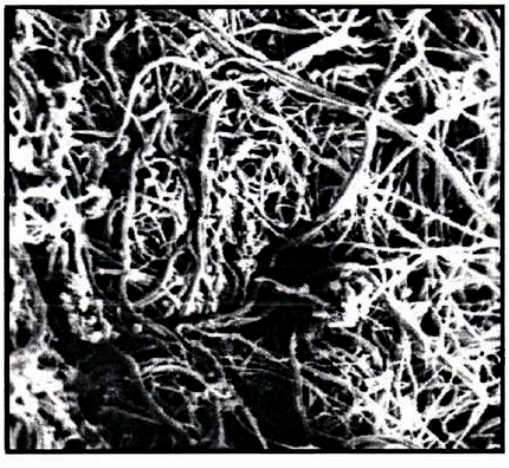
En conclusión, se demostró que las redes de fibrina obtenidas en presencia de homocisteína presentan características diferentes respecto al control; con fibras más cortas, gruesas y ramificadas, resultando en una trama más compacta. Estos resultados generarían coágulos más resistentes a la fibrinolisis. Además, el grupo –SH estaría involucrado en los cambios observados. Estos hallazgos constituyen un nuevo aporte para el esclarecimiento de los mecanismos implicados en el efecto trombogénico de la hiperhomocisteinemia.

Control

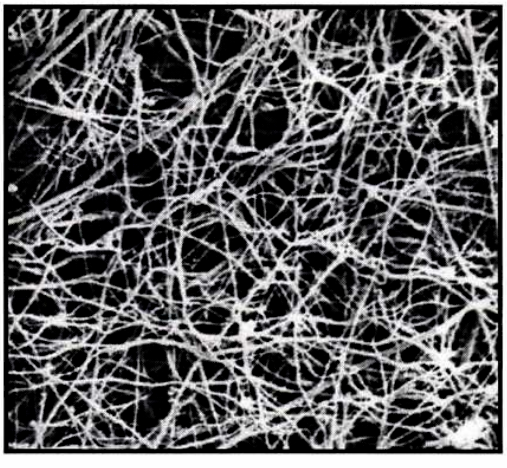


Homocisteína

Cisteína



Homocistina



1 μm

Imágenes de microscopía electrónica de barrido. Redes de fibrina obtenidas a partir de plasma incubado con PBS (control), homocisteína, cisteína y homocistina.

EVALUACIÓN DE COMPONENTES INVOLUCRADOS EN LA FIBRINOFORMACIÓN

En base a los hallazgos obtenidos en la fibrinoformación, se planteó si altas concentraciones de Hcy causarían modificaciones o alteraciones de algunos de los componentes involucrados en la red de fibrina. Con este objetivo se realizaron experiencias a partir de fibrinógeno (Fbg) puro y de concentrado de factor XIII (FXIII).

- ***Fibrinógeno***

Teniendo en cuenta la relación molar de las muestras que se utilizaron para la formación de las redes de fibrina y considerando a la concentración plasmática media de Fbg = 300 mg/dl, se prepararon las muestras M_1 (incubación 1 h, 37 °C); M_2 (incubación 4 hs, 37 °C) y los controles respectivos, C_1 y C_2 (con *buffer* PBS):

900 µl Fbg + 100 µl Hcy $\xrightarrow{\text{37 °C, 1 h}}$ M_1

900 µl Fbg + 100 µl PBS $\xrightarrow{\text{"}}$ C_1

900 µl Fbg + 100 µl Hcy $\xrightarrow{\text{37 °C, 4 hs}}$ M_2

900 µl Fbg + 100 µl PBS $\xrightarrow{\text{"}}$ C_2

Además, se prepararon las muestras M_3 y M_4, con mayor proporción de Hcy respecto al Fbg:

500 µl Fbg + 500 µl Hcy $\xrightarrow{\text{37 °C, 1 h}}$ M_3

500 µl Fbg + 500 µl PBS $\xrightarrow{\text{"}}$ C_3

500 µl Fbg + 500 µl Hcy $\xrightarrow{\text{37 °C, 4 hs}}$ M_4

500 µl Fbg + 500 µl PBS $\xrightarrow{\text{"}}$ C_4

Las soluciones de fibrinógeno y homocisteína se prepararon a partir de los reactivos descriptos en la sección de *Materiales y Métodos*, en concentraciones iniciales según se indican:

Fbg (en PBS) = 300 mg/dl Hcy (en PBS) = 3 mM

Para evaluar los posibles efectos de la Hcy sobre el Fbg se realizaron las siguientes determinaciones:

Actividad. En cada una de las muestras y controles se determinaron los niveles de Fbg por actividad coagulante (Método de Clauss). Las muestras se prepararon por triplicado y las determinaciones se realizaron por duplicado. Los datos obtenidos, expresados como mediana y rango, se muestran en la Tabla 32. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de Fbg de cada muestra respecto a su control.

Tabla 32. Actividad coagulante de fibrinógeno en muestras incubadas con Hcy (*M*) o PBS (*C*).

	Fbg (mg/dl)							
	M_1	C_1	M_2	C_2	M_3	C_3	M_4	C_4
Mediana	217	220	214	212	142	145	139	140
Rango	215-221	217-222	211-217	211-215	139-145	140-147	136-141	136-142

M_1 - M_4 y C_1 - C_4: ver descripción en el texto.

Electroforesis. Se realizó la corrida electroforética en gel de poliacrilamida con SDS, de cada una de las muestras incubadas con Hcy y de los controles respectivos. Además, se corrió la solución de Fbg utilizado en la experiencia y de Fbg pretratado con un agente reductor (2-mercaptoetanol). Se desarrolló la electroforesis vertical en mini-geles (ver condiciones en sección *Materiales y Métodos*). En cada calle se sembraron 10 µl de cada muestra, con igual concentración proteica (0,6 mg/ml). El perfil electroforético obtenido se muestra en la figura 25.

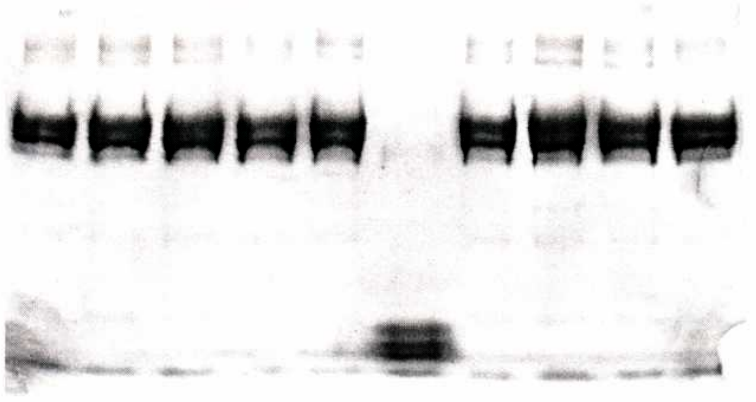


Figura 25. Electroforesis (SDS-PAGE) de las muestras de fibrinógeno incubado con Hcy o PBS (ver descripción en el texto).
De izq. a der.: C_1, M_1, C_2, M_2, Fbg_{puro}, $Fbg_{reducido}$, C_3, M_3, C_4, M_4.

Las bandas obtenidas en todas las calles (excepto la calle 6) no presentaron alteraciones del perfil electroforético entre las distintas muestras (M_1, M_2, M_3, M_4 y Fbg_{puro}) y entre cada muestra y su control. Sólo en la calle 6 (*Fbg* + *reductor*) se observa modificación de las bandas respecto a la solución de Fbg_{puro}.

- ***Factor XIII***

En este caso también se realizaron las determinaciones de actividad y las electroforesis de diversas muestras para evaluar si la Hcy afecta al factor XIII.

Actividad. Se determinó por el método espectrofotométrico y la prueba de solubilidad en urea. Estas determinaciones requieren la presencia de Fbg, por lo que las muestras utilizadas se prepararon a partir de plasma. Con el fin de reproducir la relación de los componentes utilizados en la experiencia de la fibrinoformación se incubó plasma con Hcy en la siguiente proporción (se prepararon los controles correspondientes con solución fisiológica):

900 µl Plasma + 100 µl Hcy $\xrightarrow{37\ °C,\ 1\ h}$ M_5

900 µl Plasma + 100 µl SF $\xrightarrow{''}$ C_5

Se preparó la muestra M_6, con mayor proporción de Hcy respecto al plasma:

500 µl Plasma + 500 µl Hcy $\xrightarrow{37\ °C,\ 1\ h}$ M_6

500 µl Plasma + 500 µl SF $\xrightarrow{''}$ C_6

Considerando que 1 ml de plasma contiene 1 U de FXIII y que la solución preparada a partir del concentrado de factor XIII humano contiene 62,5 U/ml, se realizaron incubaciones previas de FXIII con Hcy (y sus controles con SF) en dos proporciones:

a) relación de los componentes en el sistema 900 µl Plasma + 100 µl Hcy

15 µl FXIII + 100 µl Hcy $\xrightarrow{37\ °C,\ 1\ h}$ A

15 µl FXIII + 100 µl SF $\xrightarrow{''}$ A'

b) relación al medio de ambos componentes

50 µl FXIII + 50 µl Hcy $\xrightarrow{37\ °C,\ 1\ h}$ B

50 µl FXIII + 50 µl SF $\xrightarrow{''}$ B'

En todos los casos la concentración de la solución de Hcy utilizada fue 3 mM.

Como las determinaciones de actividad de FXIII requieren componentes plasmáticos, los sistemas A y B se realizaron con plasma, según:

500 µl Plama + 500 µl A $\xrightarrow{\text{Sin incubación}}$ M_7

500 µl Plasma+ 500 µl A' $\xrightarrow{''}$ C_7

500 µl Plama + 500 µl *B* —Sin incubación→ M_8

500 µl Plasma+ 500 µl *B'* —"→ C_8

Las muestras y las determinaciones se realizaron por duplicado. La actividad de FXIII (por el método espectrofotométrico) de cada muestra y control se muestran en la Tabla 33, (datos expresados como mediana y rango).

Tabla 33. Actividad de factor XIII en las muestras incubadas con Hcy (*M*) o SF (*C*).

	FXIII (%)							
	M_5	C_5	M_6	C_6	M_7	C_7	M_8	C_8
Mediana	98	97	55	53	198	197	249	246
Rango	97-100	95-99	53-56	50-55	195-201	194-200	245-250	242-250

M_5 - M_8 y C_5 - C_8: ver descripción en el texto.

No se observaron diferencias significativas entre los niveles de FXIII de cada muestra respecto a su control.

La actividad de FXIII también se determinó por la prueba de solubilidad en urea. Con esta técnica se evaluaron las mismas muestras dosadas por el método espectrofotométrico.

La consistencia y disolución de los coágulos se realizó a las 24, 30, 40, 50 y 65 hs. En la Tabla 34 se muestran cualitativamente los resultados de la experiencia.

Tabla 34. Prueba de solubilidad en urea.

	M_5	C_5	M_6	C_6	M_7	C_7	M_8	C_8
24 hs.	-	-	-	-	-	-	-	-
30 hs.	-	-	-	-	-	-	-	-
40 hs.	+	+	+	+	-	-	-	+
50 hs.					+	+	-	
65 hs.							+	

+: Tiempo de disolución total del coágulo.
M_5 - M_8 y C_5 - C_8: ver descripción en el texto.

Electroforesis. Se realizó la corrida electroforética en gel de poliacrilamida con SDS de la solución de $FXIII_{puro}$, de las muestras de FXIII incubado con Hcy y de los controles. Se desarrolló la electroforesis vertical en mini-geles y en cada calle se sembraron 10 µl de cada muestra, con igual concentración proteica (0,6 mg/ml). El perfil electroforético obtenido se muestra en la figura 26.

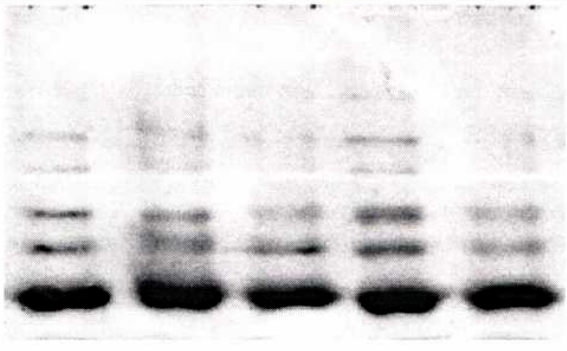


Figura 26. Electroforesis (SDS-PAGE) de las muestras de factor XIII incubado con Hcy o SF (ver descripción en el texto). De izq. a der.: *$FXIII_{puro}$, A, A', B, B'.*

Las bandas obtenidas en todas las calles no mostraron alteraciones del perfil electroforético entre las distintas muestras (*A*, *B y $FXIII_{puro}$*) y entre cada muestra y su control.

DISCUSIÓN

Las alteraciones halladas en las redes de fibrina obtenidas en presencia de Hcy, plantearon el interrogante acerca de cuáles serían los componentes involucrados en la fibrinoformación que estarían afectados por altas concentraciones del aminoácido. Si bien en la generación del trombo *in vivo* intervienen los componentes sanguíneos, en el modelo experimental utilizado, se excluyeron a los eritrocitos, linfocitos y plaquetas. Por lo tanto, los cambios observados estarían asociados sólo a modificaciones de

compuestos plasmáticos. B. Blömback demostró que diferentes factores del plasma modulan la red de fibrina, en particular postuló que cambios estructurales en el fibrinógeno (Fbg) podrían generar coágulos trombogénicos, difíciles de lisar[205]. Por otra parte, estudios recientes mostraron que sustancias con grupos *tiol* en la molécula, incrementan el grado de entrecruzamiento del fibrinógeno y fibrina mediado por el factor XIII (FXIII)[206]. En base a estos reportes y a los resultados del presente trabajo se postula que altas concentraciones de homocisteína podrían modificar la estructura y/o función del Fbg y del FXIII.

Para la evaluación del fibrinógeno se consideró que las posibles reacciones con Hcy no son de tipo enzimático, por lo que la magnitud de la modificación proteica sería proporcional al nivel de Hcy plasmática y al tiempo que la proteína estuviera en contacto con el aminoácido. Por lo tanto, se prepararon las muestras M_1, M_2, M_3 y M_4 (y los controles respectivos). La Tabla 32 muestra que no se evidenciaron diferencias significativas entre los niveles de Fbg, determinados por el método de Clauss, de cada muestra respecto a su control. Este hecho sugiere que la Hcy no afectaría la liberación de los fibrinopéptidos A y B de la región aminoterminal de las cadenas Aα Bβ respectivamente, para la conversión del Fbg en monómeros de fibrina. La ausencia de diferencias en los tiempos de coagulación (por Clauss) entre cada muestra y su control plantean, además, que la Hcy no modificaría la agregación y polimerización de los monómeros de fibrina. Por otra parte, tampoco se observaron alteraciones del perfil electroforético (sistema SDS-PAGE) entre cada muestra y su control., por lo que no habrían modificaciones importantes en la estructura del Fbg. La presencia del grupo *tiol* en la molécula de Hcy, le confiere propiedades oxidantes y/o reductoras, dependiendo del potencial redox del medio[10]. Para evaluar esta característica, se comparó con el efecto producido con 2-mercaptoetanol (2-ME), reconocido agente reductor en los sistemas biológicos. La calle 6 del gel de poliacrilamida muestra la corrida electroforética del Fbg tratado con 2-ME. Se observan las tres bandas características de las cadenas Aα, Bβ y γ del Fbg, que surgen de la reducción de puentes disulfuros intercadenas. Este patrón no

se observa en el resto de las calles del gel, sugiriendo que la Hcy no ejercería un efecto reductor sobre el Fbg, al menos en las condiciones de las muestras analizadas.

En la evaluación del factor XIII, los resultados de la determinación de actividad por el método espectrofotométrico mostraron valores levemente aumentados en las muestras con Hcy respecto a cada control, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 33). Por otra parte, con la prueba de solubilidad en urea, las muestras de plasmas incubados con Hcy en distintas proporciones (M_5 y M_6) y los controles (C_5 y C_6), mostraron resultados semejantes (tiempo de disolución = 40 hs.). Esto sugeriría la generación de coágulos de consistencia similar. Cuando la incubación con Hcy se realizó directamente con FXIII (muestras *A* y *B*) y posterior agregado de plasma (M_7 y M_8), la disolución de los coágulos obtenidos, ocurrió entre las 50 y 65 hs. Esto se explicaría porque estas muestras tienen mayor concentración de FXIII respecto a M_5 y M_6. Los resultados obtenidos con la muestra M_7 fueron similares al control C_7, mientras que en las condiciones de M_8 y C_8 se observó una diferencia importante en los tiempos de disolución del coágulo: 65 hs. para la muestra con Hcy y 40 hs. para su control.

Si bien no se observó un aumento significativo de la actividad del FXIII en los sistemas con Hcy respecto a los controles (método espectrofotométrico), sí se infirió que los coágulos obtenidos en presencia de Hcy con las muestras M_8 resultaron notablemente más estables que con los controles C_8 (prueba con urea). La diferencia de resultados entre los dos métodos podría explicarse por la diferencia de fundamentos de las técnicas. En el método espectrofotométrico, la concentración de FXIII se determina indirectamente a través de reacciones químicas en las que intervienen sustratos *no* fisiológicos y fundamentalmente, refleja cantidad de la proteína. En cambio, con la prueba de solubilidad en urea se infieren los niveles de FXIII mediante su función específica (estabilización de la red de fibrina) en un sistema fisiológico: el $FXIII_{activado}$ (transglutaminasa), que se genera por el agregado de trombina e iones Ca^{2+}, entrecruza las cadenas α y γ de la fibrina, lo que confiere estabilidad mecánica a la red formada. La activación del FXIII presupone un cambio conformacional, permitiendo el acceso de su

sustratos, principalmente Fbg y fibrina, a la tríada catalítica (cisteína - histidina - ác. aspártico) del sitio activo de la molécula de FXIII[207]. Se ha postulado que el grupo *tiol* de la cisteína debe permanecer en estado reducido para que la proteína actúe como transglutaminasa[208]. Por lo tanto, en el sistema de la experiencia es probable que la Hcy asegure un medio reductor. Además, la Hcy podría intervenir en reacciones de intercambio de disulfuros, favoreciendo la alineación de los monómeros de fibrina, indispensable para la formación de la red.

Similarmente a lo observado con el Fbg, el patrón electroforético obtenido con las muestras de FXIII sugiere que la Hcy no modificaría la estructura de la proteína.

En base a los resultados hallados, puede postularse que la homocisteína afectaría la actividad del factor XIII, incrementando el entrecruzamiento de los monómeros de fibrina. Por lo tanto, el factor XIII sería uno de los componentes involucrados en la fibrinoformación, responsable de las redes compactas y muy ramificadas, obtenidas en presencia de homocisteína.

CONCLUSIONES

Uno de los puntos de interés en el área de hemostasia es la prevención y tratamiento de la trombosis. En el siglo XIX Virchow postuló tres grupos de causas principales para la formación del trombo: cambios en la composición de la sangre, en las propiedades de la pared vascular y/o en el flujo sanguíneo. Si bien estos conceptos siguen vigentes, actualmente se considera a la trombosis como una patología multicausal resultante del efecto de factores genéticos y adquiridos que interactúan entre sí. Se ha avanzado notablemente en el conocimiento de este tema, pero en algunos casos aún no puede explicarse la patogénesis del episodio trombótico.

En la investigación de condiciones asociadas a un incremento de la enfermedad se describieron nuevos factores de riesgo que actualmente se han incorporado a los tradicionalmente conocidos. En los últimos años se ha postulado que la presencia de una concentración elevada de homocisteína en la circulación sanguínea (hiperhomocisteinemia) constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad vascular oclusiva y en particular para la trombosis.

A nivel internacional recién en la década del '90 se realizaron estudios epidemiológicos que postularon a la hiperhomocisteinemia como un factor de riesgo independiente para la enfermedad aterotrombótica, afectando al sistema vascular arterial y venoso.

Para evaluar los niveles de homocisteína en diversos grupos poblacionales fue prioritario disponer de un método analítico accesible y confiable. Con este fin se realizó la validación de una técnica de ELISA que, si bien se disponía comercialmente no existían reportes internacionales que avalaran los resultados de esta técnica. *El estudio demostró que este método provee datos equivalentes a los de HPLC (método de referencia) y presenta coeficientes de variación del intra e inter-ensayo que avalan la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.*

Disponiendo de la metodología de evaluación de Hcy se analizaron variables de la fase pre-analítica para la optimización de los resultados inferidos. *Se concluyó que las muestras más apropiadas para la determinación de homocisteinemia son los plasmas en EDTA o los sueros obtenidos con gel separador. Los valores determinados en las muestras*

conservadas a -70 °C no se modificaron por los congelamientos y descongelamientos sucesivos. Respecto a la variabilidad biológica, podemos concluir que en períodos cortos de tiempo, no se observan cambios significativos en los niveles de Hcy de cada individuo.

Se analizó la concentración plasmática de Hcy en la población normal. En particular, se determinó la homocisteinemia en individuos sanos de Buenos Aires. *Los resultados mostraron que para la población entre 3 y 59 años los valores de homocisteinemia están comprendidos entre 5,0 y 19,2 μM. El análisis en grupos etáreos extremos mostró que para los neonatos los valores son 1,2 - 11,6 μM, mientras que para sujetos mayores de 60 años el intervalo resultó 6,0 - 30,0 μM. Estos resultados, sin embargo, no deben considerarse como valores de referencia. Por el contrario, en el análisis de valores de corte se determinó que el nivel óptimo para homocisteinemia debe ser ≤ 12 μM. Los datos de Hcy obtenidos en la población "normal" de Buenos Aires muestran una prevalencia elevada de hiperhomocisteinemia y sugieren deficiencias vitamínicas subclínicas, probablemente asociadas a los hábitos alimentarios de nuestra población. Por lo tanto, aproximadamente el 50% de la misma estaría expuesto a un mayor riesgo de desarrollo de enfermedad vascular.*

A través de los estudios realizados se demostró que la homocisteinemia aumenta con la edad de los individuos y es mayor en los hombres que en las mujeres. Como se ha comentado, la homocisteinemia es la resultante del efecto directo y de la interacción de factores genéticos y adquiridos. *En particular, se encontró que en la población mayor de 65 años existe una relación inversa entre la Hcy plasmática y los niveles séricos de vitamina B_{12} y de ácido fólico; miesntras que la correlación resultó positiva con los niveles de creatinina. Pacientes bajo tratamiento crónico de anticoagulación oral con restricción de ingesta de vegetales verdes (con alto contenido de folatos), evidenciaron un déficit importante de ácido fólico intraeritrocitario y un aumento significativo en los niveles de Hcy respecto a los individuos sin restricción dietaria. Estos resultados sugieren que los pacientes bajo anticoagulación oral con dieta restringida estarían expuestos a efectos contradictorios: el tratamiento anticoagulante reduciría la incidencia de trombosis, pero la hiperhomocisteinemia inducida por la dieta favorecería el desarrollo de eventos aterotrombóticos, contrarrestando los beneficios de la terapéutica.*

Además, se demostró que la ingesta de una dieta que aporte 400 µg/día de ácido fólico por día, disminuye significativamente los niveles de homocisteína plasmática. Sin embargo, aún no se ha establecido si este descenso disminuye el riesgo de la enfermedad vascular. Cuando finalicen los trabajos prospectivos de intervención terapéutica en curso, se dispondrá de evidencias confiables para determinar la verdadera asociación entre Hcy y la enfermedad aterotrombótica.

Respecto al efecto de alteraciones genéticas sobre la homocisteinemia se estudió el polimorfismo C677T de la metilentetrahidrofolato reductasa. Los resultados mostraron que lo niveles de Hcy aumentarían sólo cuando la mutación está presente en individuos homocigotas. Pero la presencia de esta variante termolábil no resultó factor de riesgo independiente para la trombosis venosa, ni aún en homocigosis.

Si bien los trabajos internacionales y los resultados de esta tesis relacionan a la hiperhomocisteinemia con los episodios trombóticos, no hay resultados concluyentes de la acción de la Hcy sobre la función vascular *in vivo*. Existen pocos estudios que hayan evaluado los niveles de marcadores de daño endotelial en hiperhomocisteinemia. *En este sentido, nuestros resultados mostraron que los niveles de factor von Willebrand y de dermatán sulfato se encuentran significativamente aumentados en individuos hiperhomocisteinémicos mayores de 65 años, planteando un interrogante acerca de la función del dermatán sulfato.*

En los sistemas *in vitro* y *ex vivo* se investigaron los posibles efectos que la Hcy podría ejercer sobre diversos componentes del sistema hemostático. Para los ensayos *in vitro* se utilizaron concentraciones elevadas de Hcy pero posibles de detectar *ex vivo*, al menos en ciertas patologías (en pacientes homocistinúricos los niveles de Hcy pueden llegar a 0,4 - 0,5 mM).

Los modelos experimentales ensayados no evidenciaron alteraciones en las plaquetas, los factores de coagulación y en la fibrinolisis, cuando estos componentes fueron evaluados en pruebas del laboratorio de hemostasia. Un hallazgo significativo en estas experiencias resultó la probable alteración de la estructura del colágeno mediada por la Hcy.

En los ensayos de fibrinoformación se observó un efecto notable de la Hcy sobre la estructura de la red de fibrina. Se demostró que en presencia del aminoácido se obtienen

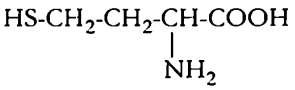
redes compactas con fibras cortas, gruesas y muy ramificadas, que generarían coágulos más resistentes a la fibrinolisis. Otros resultados del estudio sugieren que esta acción de la Hcy estaría mediada por su grupo tiol y que uno de los componentes de la fibrinoformación afectados por el aminoácido sería el factor XIII.

Los resultados de esta tesis contribuyen al conocimiento acerca de la acción de la Hcy y su relación con la hemostasia y plantean un mecanismo diferente de los propuestos hasta el momento, que permitiría explicar parcialmente la acción trombogénica de la homocisteína.

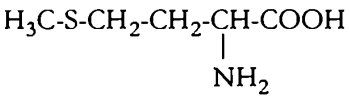
APÉNDICE

FÓRMULAS QUÍMICAS

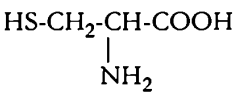
Homocisteína y moléculas relacionadas



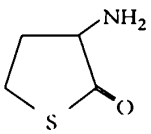
Homocisteína



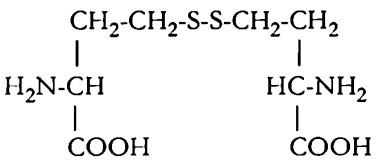
Metionina



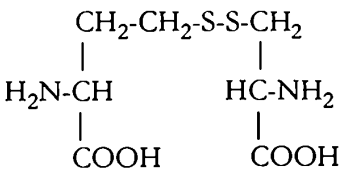
Cisteína



Homocisteína tiolactona

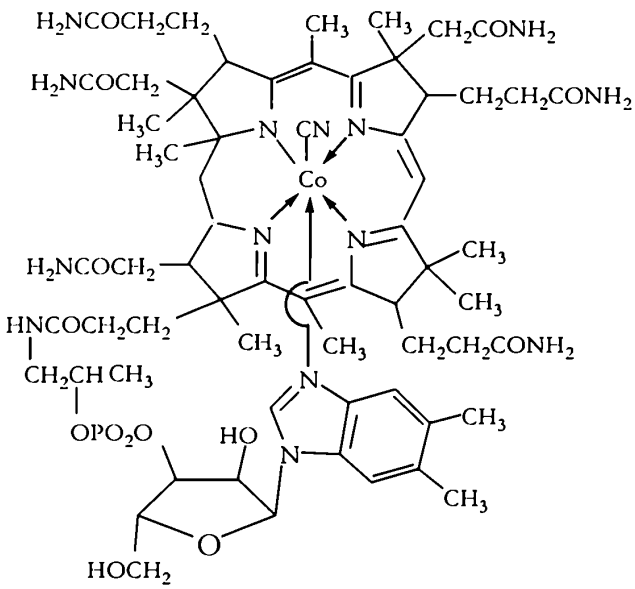


Homocistina

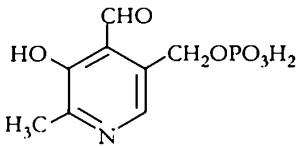


Dímero mixto:
Homocisteína - Cisteína

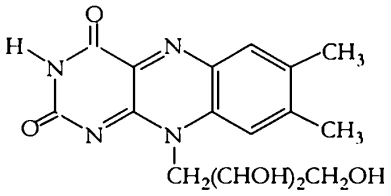
Coenzimas del metabolismo de la homocisteína



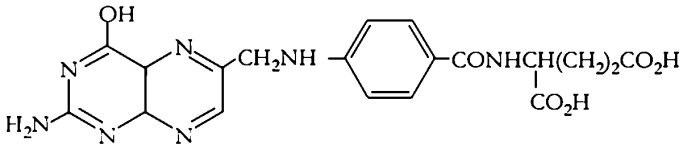
Vitamina B_{12}



Vitamina B_6



Vitamina B_2



Ácido Fólico

ABREVIATURAS

AF	ácido fólico
BHMT	betain-homocistein-metil transferasa
CβS	cistationin-β sintetasa
DHF	dihidrofolato
DO	densidad óptica
DS	dermatán sulfato
ELISA	enzimoinmunoensayo
EVO	enfermedad vascular oclusiva
Hcy	homocisteína
HHcy	hiperhomocisteinemia
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
MTHFR	metilentetrahidrofolato reductasa
MAT	metioninadenosil transferasa
MS	metionin sintetasa
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	*buffer* fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PRP	plasma rico en plaquetas
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
THF	tetrahidrofolato
TV	trombosis venosa

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stampfer M, Malinow R, Willett W, *et al.* A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA 1992; 268:877-881.*

2. Brattstrom L, Lindgren A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for stroke. *Neurol Res 1992; 14:81-84.*

3. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, *et al.* Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation 1989; 79:1180-1188.*

4. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood 1997; 90:1-11.*

5. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem 1990; 1:228-237.*

6. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, *et al.* S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J 1996; 10(4):471-480.*

7. Kery V, Bukovska G, Kraus JP. Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5´-phosphate. *J Biol Chem 1994; 269:25283-25288.*

8. Mudd SH, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism 1975; 24:721-735.*

9. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):219-225.*

10. Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):227-232.*

11. Refsum H, Guttormsen A, Fiskerstrand T, Ueland PM. Hyperhomocysteinemia in terms of steady-state kinetics. *Eur J Pediatr 1998; 157(supl. 2):45-49.*

12. Finkelstein J, Martin J. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem 1984; 259:9508-9513.*

13. Hillman R: Fármacos hematopoyéticos. Factores de crecimiento, minerales y vitaminas. En: Hardman J, Limbird L. Bases farmacológicas de la terapéutica; México DF: McGraw-Hill Interamericana; 1996. pp 1414-1418.

14. Mathews C, Van Holde K: Biochemistry. Nueva York: Cummings Publishing Company; 1995, pp 721-723.

15. Nelson D, Davey F: Hematopoyesis. En: Henry J. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio; Barcelona: Salvat; 1990. pp 814-817.

16. Miller J, Nadeau M, Smith D, Selhub J. Vitamin B_6 deficiency vs. folate deficiency: comparison of responses to methionine loading in rats. *Am J Clin Nutr 1994; 59:1033-1039.*

17. Matthews RG, Sheppard C, Goulding C. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: Biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr 1998; 157 (supl. 2):S54-S59.*

18. Rozen R. Genetic modulation of homocisteinemia. *Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):255-261.*

19. Chanarin I, Deacon R, Lumb M, Muir M, Perry J. Cobalamin-folate interrelations: a critical review. *Blood 1985; 66(3):479-489.*

20. Yap S, Naughten E, Wilcken B, Wilcken D, Boers G. Vascular complications of severe Hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine β-synthase deficiency: Effects of homocysteine-lowering therapy. *Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):335-340.*

21. Kraus JP, Miroslav J, Viktor K, *et al.* Cystathionine β-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat 1999; 13:362-375.*

22. Frosst P, Blom H, Milos R *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet 1995; 10:111-113.*

23. Genoud V, Castañon M, Annichino-Bizzacchi J, Korin J, Kordich L. Prevalence of three prothrombotic polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. *Thromb Res 2000; 100:127-131.*

24. Goyette P, Sumner JS, Milos R, *et al.* Human methylenetetrahydrofolate reductase isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet 1995; 7:195-200.*

25. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab 1998; 64:169-172.*

26. Chen L, Liu M-L, Hwang H-Y, *et al.* Human methionine synthase. *J Biol Chem 1997; 272:3628-3634.*

27. Fenton A, Rosenberg L: Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease; Nueva York: Mc Graw –Hill; 1995.

28. Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost 2000; 26(23):263-279.*

29. Pietrzik K, Bronstrup A. Vitamins B_{12}, B_6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. *Eur J Pediatr 1998; 157 (supl. 2):S135-S138.*

30. Wilcken DE, Gupta VJ. Sulphur containing amino acids in chronic renal failure with particular reference to homocysteine and cysteine- homocysteine mixed disulphide. *Eur J Clin Invest 1979; 9:301-307.*

31. Hultberg B, Andersson A, Sterner G. Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol 1993; 40:230-235.*

32. Van Guldener C, Robinson K. Homocysteine and renal disease. *Semin Thromb Hemost 2000; 26:313-324.*

33. Boston AG, Lathrop L. Homocysteinaemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int 1997; 52:10-20.*

34. Hernanz A, Plaza A, Martin-Mola E, De Miguel E. Increased plasma levels of homocysteine and other thiol compounds in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem 1999; 32:65-70.*

35. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N England J Med 1998; 338:1042-1050.*

36. Green R, Miller J. Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: Hyperhomocysteinemia and other manifestations of dysfunctional folate status. *Semin Hemat 1999; 36:47-64.*

37. Vaccaro O, Ingrosso D, Rivellese A, Greco G, Riccardi G. Moderate hyperhomocysteinemia and retinophaty in insulin-dependent diabetes. *Lancet 1997; 349:1102-1103.*

38. Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O, *et al.* Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Metabolism 1998; 47:89-93.*

39. Refsum H, Ueland PM, Kvinnsland S. Acute and long term effects of high-dose methotrexate treatment on homocysteine in plasma and urine. *Cancer Res 1986; 46:5385-5391.*

40. James GK, Jones MW, Pudek MR. Homocyst(e)ine levels in patients on phenytoin therapy. *Clin Biochem 1997; 30:647-649.*

41. Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R, *et al.* The effect of a subnormal vitamin B_6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest 1996; 98:177-184.*

42. Drummond JT, Matthews RG. Nitrous oxide inactivation of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*: Characterization of the damage to the enzyme and prosthetic group. *Biochemistry 1994; 33:3742-3750.*

43. Mezzano D, Muñoz X, Martínez C, *et al.* Vegetarians and cardiovascular risk factors: Hemostasis, inflammatory markers and plasma homocysteine. *Thromb Haemost 1999; 81:913-917.*

44. Cravo M, Gloria L Selhub J, *et al.* Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: Correlation with folate, vitamin B_{12} and vitamin B_6 status. *Am J Clin Nutr 1996; 63:220-224.*

45. Kenyon S, Nicolau A, Gibbons W. The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro. *Alcohol 1998; 15:305-309.*

46. Nygård O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr 1998; 67:263-270.*

47. Wu L, Wu J, Hunt S, *et al.* Plasma homocyst(e)ine as a risk factor for early familial coronary artery disease. *Clin Chem 1994; 40:552-561.*

48. Piyathilake C, Macaluso M, Hine R, Richards E, Krumdieck C. Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B_{12}. *Am J Clin Nutr 1994; 60:559-566.*

49. Mansoor M, Kristensen O, Hervig T, *et al.* Low concentration of folate in serum and erythrocytes of smokers: Methionine loading decreases folate concentrations in serum of smokers and non-smokers. *Clin Chem 1997; 43:2192-2194.*

50. Ueland M. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem 1995; 41: 340-342.*

51. Bergmark C, Mansoor M, Svardal A, de Faire U. Redox status of plasma homocysteine and related amino-thiols in smoking and non-smoking young adults. *Clin Chem 1997; 43:1997-1999.*

52. Nygård O, Refsum H, Ueland P, *et al.* Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr 1997; 65:136-143.*

53. Stolzenberg-Solomon R, Miller E, Maguire M, Selhub J, Appel L. Association dietary protein intake and coffee consumption with serum homocysteine concentrations in an older population. *Am J Clin Nutr 1999; 69:467-475.*

54. Nygård O, Vollset SE, Refsum H, *et al.* Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. *JAMA 1995; 274:1526-1533.*

55. Hermann W, Quast S, Ullrich M, *et al.* Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: Relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetradrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis 1999; 144:91-101.*

56. Wouters MG, Morres MT, van der Mooren MJ, *et al.* Plasma homocysteine and menopausal status. *Eur J Clin Invest 1995; 25:801-805.*

57. Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30:377-379.*

58. Mallinow MR, Rajkovic A, Duell PB, Hess DL, Upson BM. The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocyst(e)ine suggests a potential role for maternal homocyst(e)ine in fetal metabolism. *Am J Obstet Gynecol 1998; 178:228-233.*

59. Andersson A, Iaksson A, Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. *Clin Chem 1992; 38:1311-1315.*

60. Ueland PM, Refsum H, Stabler S, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. *Clin Chem 1993; 39:1764-1779.*

61. Moller J, Rasmussen K. Homocysteine in plasma: Stabilization of blood samples with fluoride. *Clin Chem 1995; 41:758-759.*

62. Hughes MP, Carlson TH, McLaughlin MK, Bankson DD. Addition of sodium fluoride to whole blood does not stabilize plasma homocysteine but produce dilution effects on plasma constituents and hematocrit. *Clin Chem 1998; 44:2204-2206.*

63. Willems HP, Bos GM, Gerrits WB, den Heijer M, Vloet S, Blom HJ. Acidic citrate stabilizes blood samples for assay of total homocysteine. *Clin Chem 1998; 44:342-345.*

64. Thirup P, Ekelund S. Day-to-day postprandial and orthostatic variation of total plasma homocysteine. *Clin Chem 1999; 45:1280-1283.*

65. Selhub J, Jacques PF, Rosemberg IH, *et al.* Serum total homocysteine concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): Population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentration. *Ann Intern Med 1999; 131:331-339.*

66. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. *JAMA 1997; 277:1775-1781.*

67. Bostom A, Jacques P, Nadeau M, *et al.* Postmethionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine-Initial results from the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis 1995; 116:147-151.*

68. Mansoor M, Svardal A, Schneede J, and Ueland P. Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men. *Clin Chem 1992; 38(7):1316-1321.*

69. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med 1998; 49:31-62.*

70. Finkerstrand T, Refsum H, Kvalhelm G, Ueland P. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. *Clin Chem 1993; 39:263-271.*

71. Pastore A, Massoud R, Motti C, *et al.* Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine and 2- mercaptopropionylglycine in plasma and urine. *Clin Chem 1998; 44 (4):825-832.*

72. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem 1985; 31:624-628.*

73. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem 1987; 162:185-196.*

74. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, *et al.* Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: Sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem 1994; 40:873-881.*

75. Andersson A, Isaksson A, Brattström L, Hultberg B. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol specific postcolumm derivatization. *Clin Chem 1993; 39(8):1590-1597.*

76. D´Eramo JL, Finkelstein AE, Boccazzi FO, Fridman O. Total homocysteine levels in plasma: High- performance liquid chromatographic determination with electrochemical detection and glassy carbon electrode. *J Chromatogr 1998; 720:205-210.*

77. Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, Nordhei AD. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem 1998; 44:311-316.*

78. Shipchandler M, Moore E. Rapid, fully automated measurement of plasma homocysteine with the Abbott IMX analyzer. *Clin Chem 1995; 41(7):991-994.*

79. Vecchione G, Margaglione M, Grandone E, *et al.* Determining sulfur-containing amino acids by capillary electrophoresis: A fast novel method for total homocyst(e)ine human plasma. *Electrophoresis 1990; 20:569-574.*

80. Mc Cully K. Vascular pathology of homocysteinaemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol 1969; 56:111-128.*

81. Wilcken D, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. Possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest 1976; 57:1079-1082.*

82. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG, 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intake. *JAMA 1995; 274:1049-1057.*

83. Malinow MR, Nieto FJ, Szklo M, Chambless LE, Bond G. Carotid artery intima-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation 1993; 87:1107-1113.*

84. Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, *et al.* Relation of serum homocysteine and lipoprotein (a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis 1994; 106:9-19.*

85. Perry U, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet 1995; 346:1395-1398.*

86. Arnesen E, Refsum H, Bonan KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol 1995; 24:704-709.*

87. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, *et al.* Higher plasma homocysteine and increased susceptibility to adverse effects of low folate in early familial coronary artery disease. *Arteroscler Thromb Vasc Biol 1995; 15:1314-1320.*

88. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, *et al.* Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med 1995; 332:286-291.*

89. Chasan-Taber L, Selhub J, Rosenberg IH, *et al.* A prospective study of folate and vitamin B_6 and risk of myocardial infraction in US physicians. *J Am Coll Nutr 1996; 15:136-143.*

90. Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, *et al.* Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: finding in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis 1996; 26:27-34.*

91. Verhoef P, Hennekens CH, Allen RH, Stabler SP, Willett WC, Stampfer MJ. Plasma total homocysteine and risk of angina pectoris with subsequent coronary artery bypass surgery. *Am J Cardiol 1997; 79:799-801.*

92. Nygård O, Nordrehaug E, Refsum H, *et al.* Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med 1997; 337:230-236.*

93. Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH, for the MRFIT Research Group. Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the multiple risk factor intervention trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:1947-1953.*

94. Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, *et al.* Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation 1998; 98:204-210.*

95. Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease. Results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med 1998; 158:862-867.*

96. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, *et al.* Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med 1999; 159:38-44.*

97. Voutilainen S, Lakka TA, Hamelahti P, Lehtimaki T, Poulsen HE, Salonen JT. Plasma total homocysteine concentration and the risk of acute coronary events: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *J Intern Med 2000; 248(3):217-222.*

98. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg TH, *et al.* Serum total homocysteine concentration is related to self-reported heart attack or stroke history among men and women in the NHANES III. *J Nutr 2000; 130(12):3073-3076.*

99. Fallon UB, Ben-Shlomo Y, Elwood P, Ubbink JB, Smith GD. Homocysteine and coronary heart disease in the Caerphilly cohort: a 10 year follow up. *Heart 2001; 85(2):153-158.*

100. Vollset SE, Refsum H, Tverdal A, *et al.* Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr 2001; 74 (1):130-136.*

101. Ray JG. Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Inter Med 1998; 158(19):2101-2116.*

102. Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, Martinelli I, Mannucci PM. High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb 1994; 14:1080-1083.*

103. Fermo I, Vigano DA, Paroni R, *et al.* Prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in patients with early-onset venous and arterial occlusive disease. *Ann Intern Med 1995; 123:747-753.*

104. Den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, *et al.* Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet 1995; 345:882-885.*

105. Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, *et al.* Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med 1996; 334:759-762.*

106. Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, Rosenberg H. Plasma homocysteine and risk factor for atherothrombotic event in systemic lupus erythematosus. *Lancet 1996; 348:1120-1124.*

107. Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, *et al.* Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation 1997; 95:1777-1782.*

108. Eichinger S, Stumpflen A, Hirschl M, *et al.* Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost 1998; 80(4):566-569.*

109. Langman LJ, Ray JG, Evrovski J, Yeo E, Cole DE. Hyperhomocyst(e)inemia and the increased risk of venous thromboembolism: more evidence from a case-control study. *Arch Intern Med 2000; 160(7):961-964.*

110. Hsu TS, Hsu LA, Chang CJ, *et al.* Importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thrombosis in a Taiwanese population. A case-control study. *Thromb Res 2001; 102 (5):387-395.*

111. Clarke R, Armitage J. Vitamin supplements and cardiovascular risk: Review of the randomized trials and homocysteine-lowering vitamin supplements. *Semin Thromb Hemost 2000; 26:341-348.*

112. Nourhashemi F, Gillette-Guyonnet S, Andrieu S, *et al.* Alzheimer disease: protective factors. *Am J Clin Nutr 2000; 71(2):643S-649S.*

113. Ventura P, Panini R, Verlato C, Scarpetta G, Salvioli G. Hyperhomocysteinemia and related factors in 600 hospitalized elderly subjects. *Metabolism 2001; 50(12):1466-1471.*

114. Gonzalez-Gross M, Marcos A, Pietrzik K. Nutrition and cognitive impairment in the ederly. *Br J Nutr 2001; 86(3):313-321.*

115. Regland B, Andersson M, Abrahamson L, Bagby J, Dyrehag L, Gottfries C. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumatol 1997; 26:301-307.*

116. Miller JW. Homocysteine and Alzheimer´s disease. *Nutr Rev 1999; 57(4):126-129.*

117. Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, *et al.* Plasma homocysteine and L-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem 2001; 47(6):1102-1104.*

118. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, *et al.* Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr 200; 71(4):962-968.*

119. Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, Daly SF. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol 2001; 185(4):781-785.*

120. Mc Mullin MF, Young PB, Bailie KE, Savage GA, Lappin TR, White R. Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamin B_{12} deficiency in pregnancy. *Clin Lab Haematol 2001; 23:161-165.*

121. Guba S, Fonseca V, Fink L. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Semin Thromb Hemost 1999; 25(3):291-309.*

122. Misra H. Generation of superoxide free radical during the autooxidation of thiols. *J Biol Chem 1974; 249:2151-2155.*

123. Jacobsen D. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem 1998; 44(8):1833-1843.*

124. Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation 2001; 104 (10):1165-1170.*

125. Blom H, Kleinveld H, Boers G, *et al.* Lipid peroxidation and susceptibility of low-density lipoprotein to *in vitro* oxidation in hyperhomocysteinaemia. *Eur J Clin Invest 1995;25:149-154.*

126. Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Goligorsky M. Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vascular endothelial cells: A mechanism for development of atherosclerosis. *Circulation 2002; 105(9):1037-1043.*

127. Upchurch G, Welch G, Loscalzo J. Homocysteine, EDRF and endothelial function. *J Nutr 1996; 126:1290S-1294S.*

128. Mujumdar V, Aru G, Tgagi S. Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *J Cell Biochem 2001; 82 (3):491-500.*

129. Van Guldener C, Stehouwer C. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):281-289.*

130. Majors A, Ehrhart L, Pezacka E. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:2074-2081.*

131. Wang H, Yoshizumi M, Lai K, *et al.* Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem 1997; 272:25380-25385.*

132. Coppola A, Giovanni D, De Stefano V, Mancini F, Cerbone A, Di Minno G. Homocysteine, coagulation, platelet function, and thrombosis. *Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):243-254.*

133. Coppola A, Cerbone A, Guiotto G, *et al.* A hypercoagulable state in homocystinuria due to homozygous cystathionine β-synthase deficiency. *Thromb Haemost 1997; 78:528.*

134. Ratnoff O. Activation of Hageman factor by L-homocysteine. *Science 1968; 162:1007-1009.*

135. Rodgers G, Kane W. Activation of endogenous factor V by homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest 1986; 77:1909-1916.*

136. Fryer R, Wilson B, Gubler D, Fitzgerald L, Rodgers G. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb 1993; 13:1327-1333.*

137. 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; 92:1381-1386.*

138. Hayashi T, Honda G, Suzuki K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood 1992; 79:2930-2936.*

139. Hajjar K, Mauri L, Jacovina A, *et al.* Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. *J Biol Chem 1998; 273:9987-9993.*

140. Harpel P, Chang V, Borth W. Homocysteine and other sulphydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: A potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis and sulphydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:10193-10197.*

141. Born GV. Aggregation of blood platelets by ADP and its reversal. *Nature 1962; 194:927.*

142. Quick AJ. The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. *J Biol Chem 1935; 109:73.*

143. Kirkwood TB. Calibration of reference thromboplastins and standardization of the prothrombin time ratio. *Thromb Haemost 1983; 49:238.*

144. Langdell R, Wagner R, Brinkhous K. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests. *J Lab Clin Med 1953; 41:637-647.*

145. Biggs R: Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis. Oxford: Blackwell Sc. Publications; 1976.

146. Von Clauss A. Gerinnungsphisyologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol 1957; 17:237-247.*

147. Fickenscher K, Aab A; Stübar W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost 1991; 65:535-540.*

148. Loewy A, Eddsall J. Studies in the formation of urea insoluble fibrin. *J Biol Chem 1954; 211:829.*

149. Weisel J, Veklich Y, Collet J Francis C. Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost 1999; 82 (2):277-282.*

150. Sugo T, Nakamikawa C, Yoshida N, *et al.* End-linked homodimers in fibrinogen Osaka VI with Bβ-chain extention lead to fragile clot structure. *Blood 2000; 96(12):3779-3785.*

151. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 1970; 227:680-685*

152. Altman Douglas G. Practical Statistics for medical research. Londres: Chapman & Hall; 1992.

153. Dawson-Saunders B, Trapp R: Bioestadística médica. México DF: El Manual Moderno; 1997.

154. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet 1986; 8:307-310.*

155. Pietzsch J, Pixa A. Determination of total homocysteine. *Clin Chem 1998; 44:1781-1782.*

156. Chuang C, Lin S, Lin Y, Huang F. Effects of anticoagulants in amino acid analysis: comparisons of heparin, EDTA and sodium citrate in Vacutainer tubes for plasma preparations. *Clin Chem 1998; 44:1052-1056.*

157. Palmer-Toy D, Szczepiorkowski Z, Shih V, Van Cott E. Compatibility of the Abbott IMX homocysteine assay with citrate-anticoagulated plasma and stability of homocysteine in citrated whole blood. *Clin Chem 2001; 47:1704-1707.*

158. Duarte N, Wang X, Wilcken D. Effect of anticoagulant and time of plasma separation on measurement of homocysteine. *Clin Chem 2002; 48:665-667.*

159. Ubbink J, Vermaak W, Vandermerwe A, Becker P. The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine levels. *Clin Chem Acta 1992; 207:119-8.*

160. Ubbink J, Becker P, Hayward Vermaak WJ, Delport R. Results of B-Vitamin supplementation study used in a prediction model to define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem 1995; 41(7):1033-1037.*

161. Rasmussen K, Moller J, Lyngbak M, Pedersen A, Dybkjaer L. Age and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clinical Chemistry 1996; 42(4):630-636.*

162. Bostom A, Rosemberg I, Silbershatz H, *et al.* Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham study. *Ann Intern Med 1999; 131:352-355.*

163. Selhub J, Jacques P, Wilson P, *et al.* Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA 1993; 270:2693-2698.*

164. Kang S, Wong P, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism 1987; 36:458-462.*

165. Rosenblatt D, Whitehead M. Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. *Semin Hemat 1999; 36 (1):19-34.*

166. Wickramasinghe S. The wide spectrum and unresolved issues of megaloblastic anemia. *Semin in Hemat 1999; 36 (1):3-18.*

167. Pennypacker L, Allen R, Kelly P, *et al.* High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr 1992; 40:1197-1204.*

168. Hanger H, Sainsbury R, Gilchrist N, *et al.* A community study of vitamin B_{12} and folate levels in the elderly. *J Am Geriatr Soc 1991; 1155-1159.*

169. Klee G. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs. vitamin B_{12} and folate. *Clin Chem 2000; 46 (8):1277-1283.*

170. Zittoun J, Zittoun R. Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. *Semin Hemat 1999; 36 (1):35-46.*

171. Naurath H, Joosten E, Riezler R, *et al.* Effects of vitamin B_{12}, folate, and vitamin B_6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet 1995; 346:85-89.*

172. Herbert V, Zalusky R. Interrelations of vitamin B_{12} and folic acid metabolism: Folic acid clearance studies. *J Clin Invest 1962; 41:1263-1276.*

173. Lavoie A, Tripp E, Hoffbrand A. The effect of vitamin B_{12} deficiency on methylfolate metabolism and pteroylpolyglutamate synthesis in human cells. *Clin Sci Mol Med 1974; 47:617-630.*

174. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomized trials. *Br Med J 1998; 316:894-898.*

175. Kang SS, Zhou J, Wong P, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocisteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet 1988; 43:414-421.*

176. Guttormsen A, Ueland P, Nesthus I, *et al.* Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hypermocysteinemia (>40μmol/liter). *J Clin Invest 1996; 98:2174-2183.*

177. Gallagher P, Meleady R, Shields D, *et al.* Homocysteine and risk of coronary heart disease: Evidence for a common gene mutation. *Circulation 1996; 94:2154-2158.*

178. Donnelly J, Isolato P. Non fasting reference intervals for the Abbott IMx™ homocysteine and AxSYM™ plasma folate assays: influence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T mutation on homocysteine. *Ann Clin Biochem 2000; 37:390-398.*

179. Simioni P, Prandoni P, Burlina A, *et al.* Hyperhomocysteinemia and deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost 1996; 76(6):883-886.*

180. Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, *et al.* Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B_{12} concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr 1994; 59:940-948.*

181. Arruda V, von Zuben P, Chiaparini L, Annichino- Bizzacchi J, Costa F. The mutation Ala677→Val in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: A risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost 1997; 77:818-821.*

182. Margaglione M, D' Andrea G, D' Addedda M, *et al.* The methylenetetrahydrofolate reductase TT677 genotype is associated with venous thrombosis independently of the coexistence of the FV Leiden and the prothrombin A20210 mutation. *Thromb Haemost 1998; 79:907-911.*

183. Brattstrom L, Wilcken D, Ohrvick 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(23):2520-2526.*

184. De Stefano V, Casorelli I, Rossi E, Zappacosta B, Leone G. Interaction between hyperhomocysteinemia and inherited thrombophilic factors in venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost 2000; 26(3):305-311.*

185. Salden A, Keeney S, Hay C, Cumming A. The C677T MTHFR variant and the risk of venous thrombosis. *Br J Haematol 1997; 99:472.*

186. Keijzer M, den Heijer M, Blom H, *et al.* Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis. *Thromb Haemost 2002; 88:723-728.*

187. Fuglsang J, Stender M, Zhou J, Moller J, Falk E, Ravn H. Platelet activity and *in vivo* arterial thrombus formation in rats with mild hyperhomocysteinemia. *Blood Coag & Fibrinol 2002; 13(8):683-689.*

188. Durand P, Lussier-Cacan S, Blach D. Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *Faseb J 1997; 11(13):1157-1168.*

189. Lubec B, Fang-Kircher S, Lubec T, Blom H, Boers G. Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. *Biochim Biophys Acta 1996; 1315(3):159-162.*

190. Masse P, Colombo V, Gerber F, Howell D, Weiser H. Morphological abnormalities in vitamin B_6 deficient tarsometatarsal chick cartilage. *Scanning Microsc 1990; 4(3):667-673.*

191. Grieco A. Homocystinuria: pathogenetic mechanisms. *Am J Med Sci 1977; 273(2):120-32.*

192. Ferguson S, Smith G, Walker M. Maternal plasma homocysteine levels in women with preterm premature rupture of membranes. *Med Hypotheses 2001; 56(1):85-90.*

193. von Eckardstein A, Malinow M, Upson B, *et al.* Effects of age, lipoproteins, and hemostatic parameters on the role of homocysteinemia as a cardiovascular risk factor in men. *Arterioscler Thromb 1994; 4:460-464.*

194. Kuch B, Bobak M, Fobker M, *et al.* Associations between homocysteine and coagulation factors-A cross-sectional study in two populations of central Europe. *Thromb Res 2001; 103:265-273.*

195. Tofler G, Silbershatz H, D'Agostino R, *et al.* Prothrombotic and reduced fibrinolytic state in association with homocisteinemia: The Framingham Offspring Study. *JACC 1998; 196A:846-852.*

196. Yarnell J, Sweetnam P, Rumley A, Lowe G. Lifestyle and hemostatic risk factors for ischemic heart disease: the Caerphilly Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20(1):271-279.*

197. Bienvenu T, Ankri A, Chadefaux B, Montalescot G, Kamoun P. Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Thromb Res 1993; 70:123-129.*

198. Tofler G, D'agostino R, Jacques P, *et al.* Association between increased homocysteine levels and impaired fibrinolytic potential: potential mechanism for cardiovascular risk. *Thromb Haemost 2002; 88:799-804.*

199. Bozic M, Stegnar M, Fermo I, *et al.* Mild hyperhomocysteinemia and fibrinolytic factors in patients with history of venous thromboembolism. *Thromb Res 2000; 100:271-278.*

200. Makrides S, Ryan U: Overview of the endothelium. En: Loscalzo J, Schafer A. Thrombosis and Hemorrhage; Londres: Williams & Wilkins; 1994.

201. Constans J, Blann A, Resplandy F, *et al.* Three months supplementation of hyperhomocysteinaemic patients with folic acid and vitamin B_6 improves biological markers of endothelial dysfunction. *Br J Haem 1999; 107(4):776-778.*

202. de Jong S, Stehouwer C, van den Berg M, Vischer U, Rauwerda J, Emeis J. Endothelial marker proteins in hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost 1997; 78:1332-1337.*

203. van der Berg M, Boers G, Franken D, *et al.* Hyperhomocysteinaemia and endothelial dysfunction in young with peripheral arterial occlusive disease. *Eu J Clin Invest 1995; 25:176-181.*

204. Penc S, Pomahac B, Ericsson E, Detmar M, Gallo R. Dermatan sulfate activates nuclear factor-κb and induces endothelial and circulating intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest 1999; 103(9):1329-1335.*

205. Blombäck B. Fibrinogen and fibrin. Proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res 1996; 83 (1):1-75.*

206. Siebenlist K, Meh D, Mosesson M. Protransglutaminase (Factor XIII) mediated crosslinking of fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost 2001; 86:1221-1228.*

207. Yee V, Le Trong I, Bishop P, Pedersen L, Stenkamp R, Teller D. Structure and function studies of factor XIIIa by X-ray crystallography. *Semin Thromb Hemost 1996; 22 (5):377-384.*

208. Blömback B, Procyk R, Adamson L, Hessel B. FXIII induced gelation of human fibrinogen. An alternative thiol enhanced, thrombin independent pathway. *Thromb Res 1985; 37:613-628.*

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Validation of an enzyme immunoassay for the determination of total homocysteine in plasma.
Quintana I., Freeman D., Galarza C., Murúa A., Spence J., Kordich L.
Blood Coagulation & Fibrinolysis, 2000; 11: 235-238.

Plasmatic homocysteine response to vitamin supplementation in elderly people.
Murúa A., Quintana I., Janson J., Batista M., Cámera M., Kordich L.
Thrombosis Research, 2000; 100 (6): 495-500.

Hiperhomocisteinemia: Un factor de riesgo para enfermedad coronaria, cerebral y periférica, muy común, fácilmente corregible, pero aún no reconocido.
Galarza C., Murúa A., Janson J., Quintana I., Kordich L, Cámera M.
Revista Argentina de Medicina, 2000; II (2): 83-97.

Unsuspected hyperhomocysteinemia in chronically anticoagulated patients.
Murúa A., Quintana I., Galarza C., Alfie J., Kordich L.
Blood Coagulation & Fibrinolysis, 2001; 12: 79-80.

Prevalence of hyperhomocysteinemia in an elderly population of Buenos Aires.
Janson J., Murúa A., Quintana I., Galarza C., Pzygoda P., Waisman G., Cámera L., O'Flaherty M., Kordich L., Morales M. Cámera M.
American Journal of Hypertension 2002; 15 (5): 394-397.

Homocisteinemia de la población de Buenos Aires: Una realidad alejada de la idealidad.
Quintana I., Castañon M., Murúa A., Kordich L.
Hematología 2002; 6 (1): 2-7.

Effects of homocysteine thiol group on fibrin networks: another possible mechanism of harm.
Lauricella A, Quintana I, Kordich L.
Thrombosis Research 2002; 107: 75-79.