



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIROGIA
"DR. MANUEL VELASCO SUAREZ"

Homocisteina en enfermedad de pequeño y grandes vasos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN NEUROLOGIA CLINICA

P R E S E N T A

CLAUDIO ALBERTO GARCIA PERALES

TUTOR DE TESIS

DR. ANTONIO ARAUZ GONGORA

COAUTORES:

Dra. Yolanda Aburto Murrieta	Clínica de EVC
Dra. Elisa Alonso	Jefa de laboratorio de Genética
QFB. Aurelio Jara	Laboratorio de Genética
QFB. Angeles Fernández	Laboratorio de RIA

TUTOR:

Dr. Antonio Arauz Góngora



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres: Claudio F. y Rosa María

A mis hermanos: Martha y Carlos Alejandro

A Liliana

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente al Dr. Antonio Arauz Góngora, tutor de este proyecto, por el apoyo otorgado para la realización del mismo, además del valioso tiempo otorgado en la enseñanza a lo largo de los 3 años de mi residencia.

Una mención especial por el Dr. Mario López Gómez, adscrito de Neurología, por su asesoría y apoyo en la realización del análisis estadístico, y por sus valiosos comentarios en relación a este estudio.

Mi agradecimiento para el Laboratorio de RIA de este Instituto, a cargo de la QFB Angeles Fernández Aguilar quien se mantuvo al tanto de este proyecto para la determinación de homocisteína y vitaminas.

Al laboratorio de genética de este Instituto, a cargo de la Dra. Elisa Alonso y del QFB Aurelio Jara, así como todo su equipo de químicos, por la ayuda en la toma de muestras y en el procesamiento de las mismas.

A Carlos Espinosa por su apoyo en el reclutamiento de pacientes.

A Leticia Hoyos, compañera de residencia y muy relacionada al proyecto, por su ayuda en la atención a los pacientes de este protocolo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCION	1
1.1. Enfermedad cerebrovascular	1
1.2. Homocisteina	1
1.3. Mecanismos de hiperhomocisteinemia	2
1.4. Vitaminas y homocisteina	3
1.5. Mecanismos propuestos de daño vascular	4
1.6. Hiperhomocisteinemia y enfermedad vascular	6
2. JUSTIFICACION	9
3. HIPOTESIS	9
4. OBJETIVOS	9
5. METODOLOGIA	10
5.1. Variables	11
5.2. Criterios de inclusión	12
5.3. Criterios de exclusión	12
5.4. Métodos	12
5.4.1. Análisis estadístico	12
5.4.2. Homocisteina	12
5.4.3. Determinación de vitamina B12	13
5.4.4. Determinación de folato	13
6. RESULTADOS	15
6.1. Características de la población de estudio, descripción general	15
6.2. Medicamentos	17
6.3. Subgrupos de estudio	18
7. DISCUSION	19
8. CONCLUSIONES	22
9. BIBLIOGRAFIAS	23
10. ANEXO	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad cerebrovascular.

La enfermedad vascular cerebral, tiene un enorme impacto en la salud pública, pues constituye la primera causa de discapacidad en el adulto, la segunda causa de demencia y la tercera causa de muerte (1) Aunque existen estrategias para su tratamiento en la fase aguda, estas aún se encuentran limitadas por una corta “ventana” de tiempo de la cual disponemos para su aplicación. De tal manera que las medidas de prevención constituyen al momento la mejor estrategia efectiva en reducir el impacto de esta enfermedad.

Dentro de los nuevos factores de riesgo para enfermedad vascular destaca la hiperhomocisteinemia, siendo actualmente motivo de diversas investigaciones a fin de establecer su influencia en los diferentes sistemas, así como los mecanismos de lesión que estén implicados. Debido a que la hiperhomocisteinemia puede tener un origen nutricional, y que la población de nuestro medio presumiblemente es afectada en mayor proporción en relación a los países de primer mundo, decidimos investigar la prevalencia de este fenómeno en los pacientes que acuden a este Instituto por enfermedad vascular cerebral en su variedad de enfermedad de pequeño vaso

1.2. Homocisteina

En 1969 McCully hizo la observación de que varios defectos metabólicos se caracterizaban por 2 factores comunes: homocisteinuria y enfermedad tromboembólica prematura y propuso junto con Wilson la teoría que conjuntaba a la homocisteinuria con la aterosclerosis (2,3)

La homocisteina es un aminoácido sulfurado que se forma durante el metabolismo de la metionina, derivada de la proteína dietética. Es metabolizada por 2 vías: remetilación y transulfuración. Básicamente la remetilación por la metionina sintetasa genera homocisteina a partir de N5-metil-tetrahidrofolato, siendo la vitamina B12 un cofactor esencial para dicha enzima. La N5-N10-metilenetetrahidrofolato

reductasa funciona como un catalizador en el proceso de remetilación. En la transulfuración, la homocisteína se combina con serina para formar cistationa que posteriormente formará cisteína y esta a su vez en glutatona (2).

1.3. Mecanismos de hiperhomocisteinemia:

Al igual que con los niveles de colesterol, los niveles de homocisteína dependen tanto de factores nutricionales como genéticos. Las causas genéticas encontradas consisten en defectos enzimáticos del metabolismo de la homocisteína. Las causas nutricionales son la deficiencia de vitamina B12, B6 y ácido fólico. La vitamina B6 es un co-factor para la degradación irreversible de la homocisteína, mientras que la vitamina B12 y el ácido fólico son requeridos para la remetilación de homocisteína a metionina (2, 4).

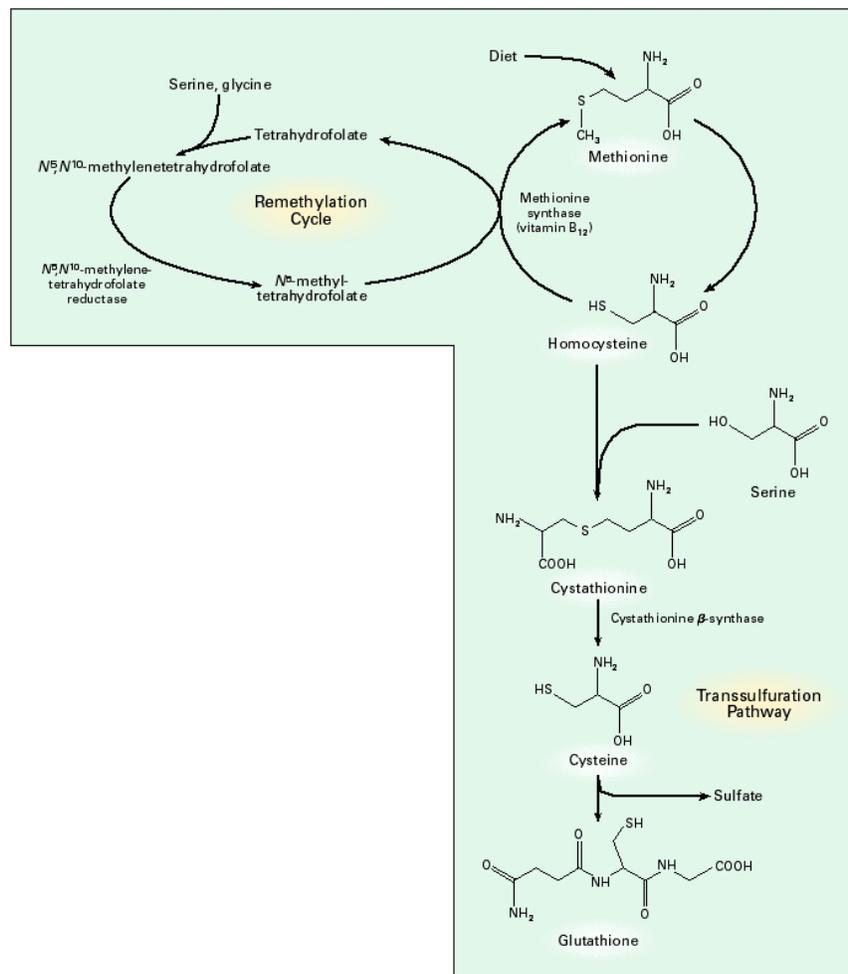


Figura 1. Tomado de Welch GN. Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *New Engl J Med* 1998;388(15):1042-50

La determinación de homocisteína total, incluye a la homocisteína, así como los disulfidos mixtos los cuales abarcan a tiolactona de homocisteína (70 a 80 % del normal), la homocisteína libre y la homocisteína unida a proteínas. La hiperhomocisteinemia puede ser leve (15 a 30 mmol por litro), moderada (30 a 100 mmol por litro) y grave (mayor de 100 mmol por litro). Además de la medición basal, se da una carga de metionina (100 mg/kg), determinándose nuevamente los niveles antes del recambio y entre 4 a 6 horas después. Si la nueva concentración de homocisteína se encuentra 2 mediciones estándar por arriba del promedio, se considera también como hiperhomocisteinemia (2)

Dentro de las causas genéticas de hiperhomocisteinemia se incluyen errores innatos del metabolismo poco frecuentes. La deficiencia de cistationa B-sintetasa es la causa más común de hiperhomocisteinemia grave, existiendo una frecuencia de 1/200 000 nacidos vivos con el estado homocigoto, y desarrollando complicaciones aterotrombóticas durante la etapa de adulto joven, con una aterosclerosis prematura severa. Los heterocigotos en cambio tienen niveles de homocisteína elevados de manera moderada. El estado homocigoto para la deficiencia de la N5-N10-metilenetetrahidrofolato reductasa, puede conducir a hiperhomocisteinemia grave, con una respuesta menor al manejo. Se ha descrito una variable termolábil de la N5-N10-metilenetetrahidrofolato reductasa consistente en una mutación puntual (C677T) en su sitio de unión, que cambia valina por alanina (4), con una prevalencia del 5 a 15 % en Canadá, pero que no parece ser un factor de riesgo independiente para enfermedad aterotrombótica, mientras que el estado homocigoto parece tener una respuesta hiperhomocisteinémica exagerada a la depleción de ácido fólico

1.4. Vitaminas y homocisteína

Las deficiencias nutricionales en vitaminas (B6, B12 y folato) que intervienen en el metabolismo de la homocisteína pueden provocar el incremento de la misma. Se han descrito concentraciones de homocisteína muy elevadas en caso de deficiencias de B12 y folato. Se ha sugerido que los niveles bajos de vitaminas en sangre pueden contribuir

con aproximadamente 2/3 de todos los casos de hiperhomocisteinemia, lo cual puede responder a la terapia suplementaria (5).

Las concentraciones de homocisteína incrementan con la elevación de la creatinina, encontrándose dicho incremento en la falla renal crónica, ocasionando niveles 4 veces por arriba de lo normal, lo cual pudiera ser un factor que contribuye a la aterosclerosis acelerada en estos pacientes. También se ha ligado la hiperhomocisteinemia con el hipotiroidismo, la anemia perniciosa y el cáncer (mama, ovárico, pancreático y leucemia linfoblástica) quizá debido a una falta de utilización de la homocisteína por las células neoplásicas. Asimismo la terapia con metotrexato (que depleta folato), la fenitoína, y la teofilina están asociadas con incremento en los niveles de homocisteína. Recientemente se ha descrito que el tabaquismo interfiere con la síntesis de fosfato de piridoxal, lo cual pudiera ser otro mecanismo por el cual produciría aterogénesis (2).

Numerosos estudios han validado la relación entre la hiperhomocisteinemia y la aterosclerosis: su relación con enfermedad cerebrovascular, enfermedad periférica vascular y coronaria, aterosclerosis prematura y trombosis venosa

Se ha estimado que el 10 % de la enfermedad arterial coronaria en la población general es atribuible a la hiperhomocisteinemia, siendo equiparable en 5 mmol/l de homocisteína con el incremento de 20 mg/dl de colesterol, sugiriendo que la ingesta de 200 mcg por día de folato, reducen la concentración de homocisteína en aproximadamente 4 mmol/l (5).

1.5. Mecanismos propuestos de daño vascular.

La evidencia actual sugiere que la hiperhomocisteinemia provoca daño vascular a través de ocasionar daño en la pared endotelial, seguida de la activación plaquetaria y la formación de trombos. Se ha demostrado que el daño endotelial ocasionado por la hiperhomocisteinemia expone la matriz subendotelial provocando la activación plaquetaria, de la misma manera se ha demostrado alteraciones en la regulación vasomotora y de las funciones anticoagulantes del endotelio, todo lo anterior posiblemente dependiente de un daño oxidativo (2).

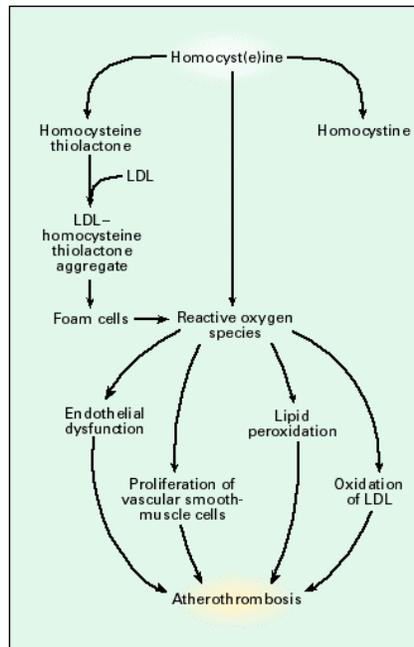


Figura 2. Welch GN. Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *New Engl J Med* 1998;388(15):1042-50

La auto-oxidación de la homocisteína en el torrente sanguíneo produce peróxido y superóxido de hidrógeno responsables del daño endotelial. La formación del radical anión superóxido y del radical hidróxido se han implicado en la peroxidación lipídica. No se conoce el mecanismo exacto pero se ha implicado también en la potenciación de la acción de los factores XII y V, y en la depresión de la activación de la proteína C. También inhibe la expresión de trombomodulina, induce la expresión del factor tisular e inhibe la expresión de heparán sulfato por parte del endotelio. La homocisteína puede disminuir la biodisponibilidad del óxido nítrico al afectar su síntesis en el endotelio dañado. Es un potente factor mitógeno para las células musculares lisas del endotelio. La tiolactona de homocisteína, producto de la oxidación de la homocisteína, combinada con la lipoproteína de baja densidad forma agregados que son tomados por los macrófagos de la íntima e incorporados a las células espumosas (2, 6).

En resumen hay evidencia que sugiere que la homocisteína es tóxica para el endotelio, es protrombótica e incrementa la producción de colágena con un decremento en la disponibilidad de óxido nítrico (6)

Varios estudios han llamado la atención hacia la hiperhomocisteinemia como un nuevo factor de riesgo para enfermedad vascular. De los primeros en llamar la atención fueron aquellos que mostraron a la hiperhomocisteinemia como un factor de riesgo independiente en individuos heterocigotos para la deficiencia de cistationa B-sintetasa (7).

Se han propuesto criterios para la determinación de la homocisteina en plasma como son:

- Aterosclerosis de inicio temprano (mujeres <65 años y hombres <55 años)
- Aterosclerosis en ausencia de factores de riesgo convencionales
- Trombofilia
- Insuficiencia renal crónica
- Transplante de órganos
- Uso de medicamentos que incrementen la homocisteina
- Enfermedades que cursen con un incremento en el recambio celular (psoriasis, tumores) (8)

1.6. Hiperhomocisteinemia y enfermedad vascular

Existe evidencia epidemiológica que apoya una asociación positiva y dosis dependiente entre los niveles de homocisteina y el riesgo de enfermedad cardiovascular, la cual es independiente de otros factores de riesgo conocidos. Sin embargo los estudios prospectivos realizados han tenido resultados inconsistentes (9). Lo que ha lleva a afirmar a algunos investigadores que este nuevo factor de riesgo no es tan importante como se cree, y que mas bien, la hiperhomocisteinemia puede ser un indicador de un estilo de vida no saludable. De tal manera que son los estilos de vida no saludables los que pesan mas como factores de riesgo que la misma hiperhomocisteinemia (10), por lo menos en relación a enfermedad cardiovascular. Un estudio reciente no demostró diferencias significativas entre los niveles de homocisteina en pacientes que desarrollaron enfermedad vascular periférica (11). A pesar de que estudios realizados en homocigotos con mutación de la cistationa-B sintetasa la mostraron como un factor de riesgo independiente para enfermedad vascular (7). Por otra parte otros investigadores sugieren que la evidencia apunta a favor de la homocisteina como factor de riesgo vascular, y que el suplemento de vitaminas podría tener un efecto benéfico en la prevención de ésta (4, 8, 12).

En cuanto a la enfermedad vascular cerebral, se han realizado diversos estudios en población de pacientes con historia de EVC versus controles sanos, así como comparando las diversas variedades de EVC. Los resultados han sido contradictorios. Recientemente ha llamado la atención la correlación que existe entre niveles elevados de homocisteína la disección de arterias cervicales (vertebral y carótida) (13, 14, 15) Evers y colaboradores encontró una diferencia significativa en los niveles de homocisteína en pacientes con EVC, en la variedad de microangiopatía (leucoaraiosis, infarto lacunar) mas no en otros tipos de infarto cerebral, encontrando en la población de pacientes con hiperhomocisteinemia, la elevación concomitante del hematocrito y ácido úrico, y una diferencia en la edad. (16).

Por otro lado al estudiar a la población de adultos jóvenes (considerados como menores de 50 años), se ha encontrado que los pacientes con EVC tienen niveles de homocisteína mayores que los controles (17). Considerando los pacientes jóvenes que desarrollan EVC Kristensen y colaboradores han sugerido que se realice en estos pacientes, la determinación de homocisteína posterior a carga de metionina a fin de detectar a los pacientes en riesgo de desarrollar esta patología (18) En otro estudio Matsui y colaboradores encontraron que la homocisteína es un factor que puede contribuir al desarrollo de infartos cerebrales silentes (19), hallazgo confirmado en otro estudio mas reciente (20).

Aparentemente los niveles de homocisteína pueden incrementar en la fase aguda del EVC, por lo que se ha sugerido no realizar las determinaciones en ese momento (21).

Se ha establecido en estudios recientes una relación directa entre la hiperhomocisteinemia y enfermedad carotídea (22), así como la presencia de ambas y el desarrollo de EVC en pacientes con estenosis mayor al 50%, encontrándose que la hiperhomocisteinemia es 3 veces mas frecuente en los pacientes que desarrollan EVC que aquellos que padecen la enfermedad carotídea y se encuentran asintomáticos (23).

También hay estudios que sugieren que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de infarto cerebral, así como de aterosclerosis de vasos intracraneales (24).

Por último Eikelboom y colaboradores, al estudiar las diversas variedades de EVC encontraron que hay una asociación clara entre los niveles de homocisteína y el infarto causado por aterosclerosis de grandes vasos y en menor proporción de pequeños vasos, apoyando el concepto de que la hiperhomocisteinemia tiene un efecto deletéreo en la pared de los vasos y que debe considerarse un agente pro-aterogénico (25).

En un estudio reciente realizado en Japón por Sasaki y colaboradores, se concluyó que niveles altos de homocisteína se correlacionaban con un mayor grado de estenosis carotídea y mayor índice de infarto lacunar (26).

Un meta-análisis reciente realizado por Kelly y colaboradores (27), apoyó la asociación entre hiperhomocisteinemia y el infarto cerebral, encontrando una influencia pobre en la susceptibilidad al mismo en los pacientes con genotipo MTHFR TT. Al promediar los niveles de homocisteína entre los pacientes con infarto y en aquellos sin infarto se encontró una diferencia de solo 2.32 mmol/l entre ambos grupos.

2. JUSTIFICACION

Como se comentó anteriormente, se ha establecido que la hiperhomocisteinemia constituye un factor de riesgo independiente para eventos isquémicos a nivel cardiovascular, vascular periférico y cerebrovascular. La homocisteína es un aminoácido formado durante el metabolismo de la metionina que se ingiere en la dieta. Existen 2 formas por las cuales se incrementa la homocisteína: alteraciones en las enzimas de su metabolismo (genéticas) y alteraciones nutricionales (ambientales). Es claro el papel de la hiperhomocisteinemia en la enfermedad cardiovascular, y estudios recientes intentan determinar su impacto en las diversas formas de enfermedad cerebrovascular. No existen estudios sobre prevalencia de la hiperhomocisteinemia en la población mexicana en relación a enfermedad cerebrovascular. Consideramos probable que la hipovitaminosis tenga una mayor participación en el origen de la hiperhomocisteinemia en los pacientes mexicanos con enfermedad cerebrovascular en relación a pacientes de países de primer mundo. Por lo anterior los factores dietéticos tendrían un mayor impacto en la población, y quizá las medidas preventivas propuestas, como el suplemento con vitaminas B6, B12 y ácido fólico, tendrían un mayor efecto en la prevención de la enfermedad vascular cerebral en nuestra población.

3. HÍPOTESIS

La presencia de hiperhomocisteinemia incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad de pequeño vaso.

Los niveles de vitaminas B6, B12 y ácido fólico son menores en pacientes con enfermedad de pequeño vaso y enfermedad de grandes vasos que en la población general.

4. OBJETIVOS

Determinar la prevalencia de hiperhomocisteinemia, en enfermedad de pequeño vaso.

Establecer el papel como factor de riesgo de la hiperhomocisteinemia en pacientes con enfermedad de pequeño vaso y de grandes vasos en relación a sujetos control.

Determinar si existe una relación entre la hiperhomocisteinemia y la deficiencia de vitaminas B6, B12 y ácido fólico.

5. METODOLOGÍA

Se realizará un estudio de casos y controles, en donde se analizarán pacientes que cumplen con los criterios internacionales actuales para el diagnóstico de la enfermedad de pequeño y grandes vasos, de acuerdo a los criterios establecidos y aceptados de manera internacional estableciendo la incidencia de los diferentes factores de riesgo conocidos para enfermedad vascular, así como la determinación de homocisteína, vitaminas B6, B12 y ácido fólico, teniendo un grupo de control, formado por pacientes sin historia de enfermedad vascular cerebral.

Se formarán por tanto 3 grupos de pacientes:

El primero de ellos formado por 15 hombres y 15 mujeres, que sean conocidos por la clínica de Enfermedad Vascular Cerebral de este Instituto y que cumplan con los criterios para enfermedad de pequeño vaso: los pacientes debieron tener clínicamente un síndrome lacunar, con un estudio de imagen (TAC, RM) normal, o mostrando lesiones menores de 1.5 cm. de diámetro, en quienes se haya descartado cardioembolismo y los estudios de Doppler y/o angiografía no hallan demostrado lesiones mayores del 50 % en la arteria ipsilateral (28).

El segundo grupo de características similares, siendo su diagnóstico el de enfermedad de grandes vasos. Serán pacientes con historia de ataques isquémicos transitorios, o evidencia clínica de infarto cerebral, en quienes los estudios de imagen (tomografía axial computada, imagen por resonancia magnética) muestran lesiones corticales, cerebelares o en tallo cerebral mayores de 1.5 cm. de diámetro, con una angiografía o Doppler de los vasos de cuello que muestre una estenosis mayor del 50% de un arteria extra o intracraneal correspondiente, excluyéndose el diagnóstico de cardioembolismo, o aquellos pacientes en los que la angiografía y/o Doppler fueron normales (28).

Por último un grupo de pacientes control, sanos, sin antecedente clínico de enfermedad vascular cerebral, no importando si presentan factores de riesgo para ello, excluyéndose aquellos que en los estudios de imagen muestren la presencia de enfermedad vascular silenciosa, los cuales serán pareados por edad y sexo con los grupos anteriores.

5.1 Variables

Se realizó determinación de homocisteína y se revisaron los otros factores de riesgo descritos para enfermedad de pequeño y grandes vasos en los pacientes que acuden a la Clínica de EVC de este Instituto, teniéndose en esta primera parte del estudio un grupo de 30 pacientes con enfermedad de pequeño vaso, en quienes se estudiaron las siguientes variables.

Edad y sexo

Peso y talla

Índice de masa corporal.

Tabaquismo

Alcoholismo

Historia de hipertensión arterial sistémica (HTA)

Número de antihipertensivos utilizados

Diabetes mellitus

Tratamiento hipoglucemiantes orales / insulina

Historia de cardiopatía isquémica

Historia de arteriosclerosis carotídea

Historia de claudicación intermitente

Historia de ingesta de metotrexato, fenitoína, teofilina

Además se les realizarán los siguientes exámenes de laboratorio y gabinete

Citometría hemática

Albúmina sérica

Glucosa

Creatinina

Perfil de lípidos (colesterol total, HDL, VLDL y triglicéridos).

Niveles de ácido fólico y vitamina B12

Niveles de homocisteína en ayuno y posterior a administrar carga de metionina

Doppler de vasos de cuello o angiografía

RM de cráneo

5.2. Criterios de inclusión

Criterios clínicos diagnósticos para enfermedad de pequeño vaso, apoyado en estudios de imagen.

Criterios clínicos de enfermedad carotídea, apoyado por estudios de imagen para diagnóstico de enfermedad de grandes vasos.

Pacientes sin antecedente de enfermedad vascular cerebral, en quienes los estudios de imagen de cráneo y de Doppler resulten normales.

Firma de consentimiento informado por parte del paciente y 2 testigos. (Anexo 1)

5.3. Criterios de exclusión

Se excluirán pacientes con antecedente de ingesta de complejos vitamínicos en los últimos 4 meses, así como aquellos que se nieguen a participar en el estudio, o no cumplan con los criterios diagnósticos.

5.4. Métodos

5.4.1. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados, respecto a las variables continuas se efectuó con prueba de t-student, sin embargo por aun no completarse el estudio, se omitieron los resultados en el presente trabajo. Las variables nominales se analizaron con chi-cuadrada.

5.4.2. Homocisteína

A todos los pacientes se les realizó en el momento del estudio determinaciones séricas de homocisteína en 2 tomas, una basal y otra posterior a la administración de una carga oral y una dieta ricas en metionina. Para la búsqueda de hiperhomocisteinemia mediante inmunoanálisis de polarización de fluorescencia, para su determinación cuantitativa en suero. Se colectaron las muestras de sangre en un tubo con anticoagulante y se congelaron a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se utilizaron $150\mu\text{l}$ de muestra de cada paciente con el ensayo AxSYM Homocysteine de ABBOTT. La homocisteína oxidada se reduce a homocisteína libre y ésta se convierte enzimáticamente en S-adenosil-L-homocisteína (SAH), utilizando SAH hidrolasa. La SAH y un trazador marcado con fluoresceína compiten por los sitios de unión de las moléculas del anticuerpo monoclonal. La intensidad de la luz polarizada fluorescente se mide con el sistema óptico FPIA. Se definió como hiperhomocisteinemia valores mayores a $12\mu\text{mol/L}$.

5.4.3. Determinación de vitamina B12

Se realizó a través de un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia, el cual esta basado en el principio de competición usando el factor intrínseco específico de la vitamina B12 el cual compite con la vitamina B12 añadida marcada con biotina para ocupar los puntos de fijación del complejo de factor intrínseco marcado con rutenio. En una primera incubación se libera al suero la vitamina B12, en una segunda incubación la muestra pretratada y el factor intrínseco marcado con quelato de rutenio forman un complejo de vitamina B12-proteínas fijadoras cuya cantidad depende de la concentración del analito en la muestra. En la 3ª incubación después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina y de vitamina B12 marcada con biotina, se forma un complejo de factor intrínseco, vitamina B12, biotina marcado con quelato de rutenio que ocupa los puntos todavía libres del factor intrínseco marcado con quelato de rutenio. El complejo entero se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de medición donde por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan con un reactivo. Con una corriente eléctrica definida,

se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen a partir de una curva de calibración.

5.4.4. Determinación de Folato

Se realizó a través de un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia, basado en un principio de test competitivo usando proteínas fijadoras de folato (FBP) naturales, específicas de folato. El folato de la muestra compete con el folato añadido, marcado con biotina para ocupar los puntos de fijación del complejo FBP marcado con quelato de rutenio. En una primera incubación el folato es liberado al suero. En la segunda incubación la muestra pretratada y la proteína fijadora de folato, marcado con rutenio forman un complejo de FBP-folato cuya cantidad depende de la concentración del analito en la muestra. En la 3ª incubación, después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina y de folato marcado con biotina se forma un complejo de FBP marcado con rutenio y folato marcado con biotina que ocupa los puntos de fijación todavía libres del FBP marcado con rutenio. El complejo entero se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a la célula de medición donde por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan con un reactivo. Al aplicar una corriente eléctrica definida, se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen a partir de una curva de calibración.

6. RESULTADOS

6.1. Características de la población de estudio, descripción general

Se estudiaron 29 pacientes, 17 fueron hombres (58.6%) y 12 mujeres (41.4%). Ninguno de los 29 pacientes tenía antecedentes personales para enfermedad carotídea, enfermedad vascular periférica o distiroidismo. Los antecedentes personales de relevancia y las variables numéricas se detallan en las tablas 1 y 2 respectivamente.

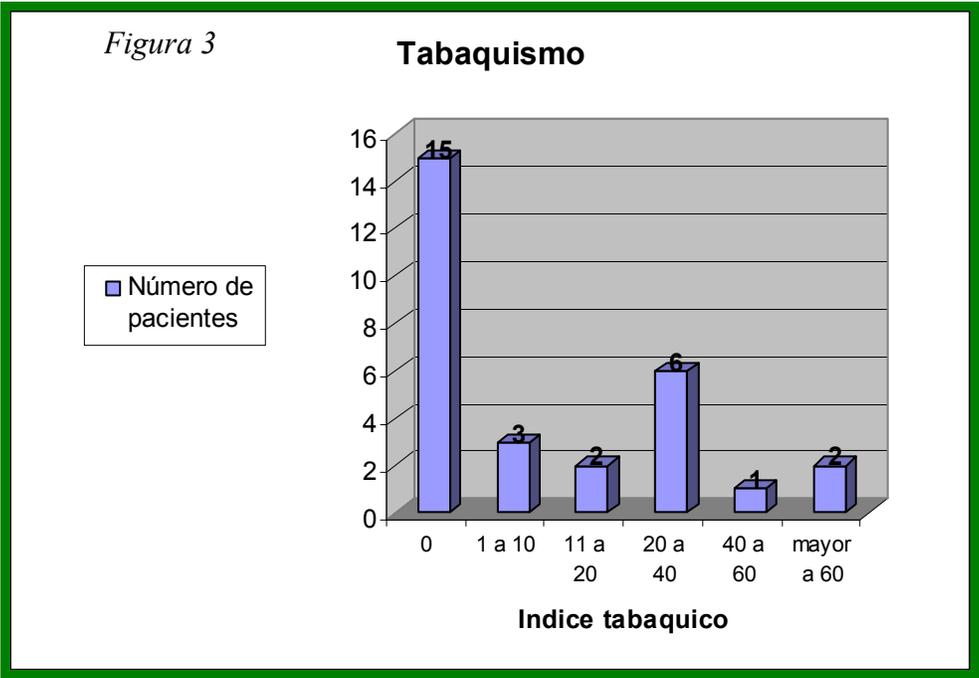
Tabla 1. Antecedentes personales de la población de estudio

	Cantidad	Porcentaje
Sexo (M/F)	17/12	58.6/41.4
Tabaquismo	14	48.3
Alcoholismo	11	37.9
Cardiopatía	4	13.8
Diabetes Mellitus	9	31
hipertensión arterial	21	72.4
Infarto único vs múltiple	14/15	48.27/51.73
Leucoaraiosis	6	20.7
Mal pronóstico	8	27.5

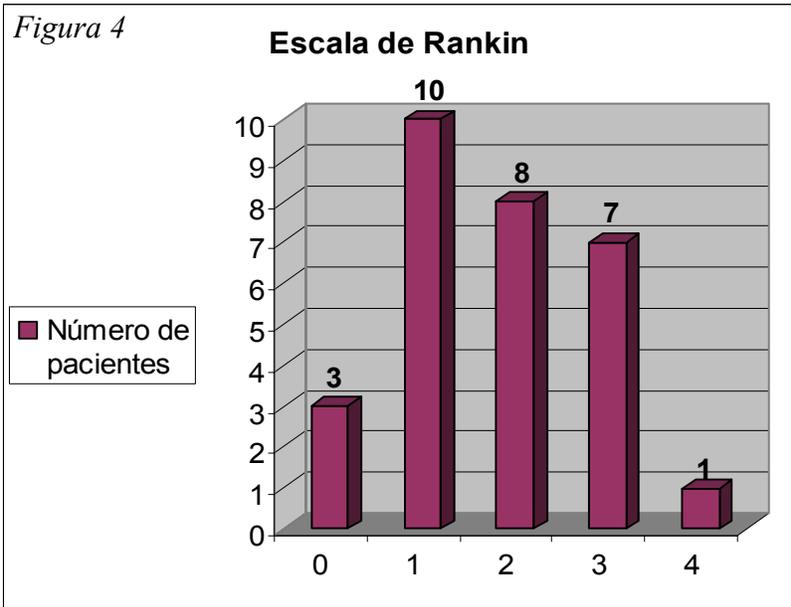
Tabla 2. Variables numéricas de la población de estudio

	Pacientes con datos	Media	Desv. estándar	Valor mínimo	Valor máximo
Edad	29	65.23	10.8	49	89
IMC	26	27.02	3.6	20.55	34.01
Colesterol	28	203.4	31.3	132	265.6
HDL	25	41.32	8.0	29	60
LDL	25	122.89	21.6	94	182
Triglicéridos	28	197.84	74.3	88	335
Glucosa	29	118.05	41.8	74.7	275.2
Creatinina	28	1.02	.3	.7	2
Hemoglobina	29	15.26	1.6	9.5	18.3
Leucocitos	29	7412.07	2086.7	4100	11300
Linfocitos	29	2106.38	889.5	1018	4618
Albúmina	29	3.94	.4	3.3	5
B12	28	5828.15	12483.9	220	60840
Folato	28	12.95	9.0	2.2	48.24
Homocisteína	29	9.23	3.6	4.2	20.10
Homocisteína postcarga	29	23.53	7.8	11.9	39.4

En la figura 3 se muestra el consumo de tabaco, determinado mediante el índice tabáquico.

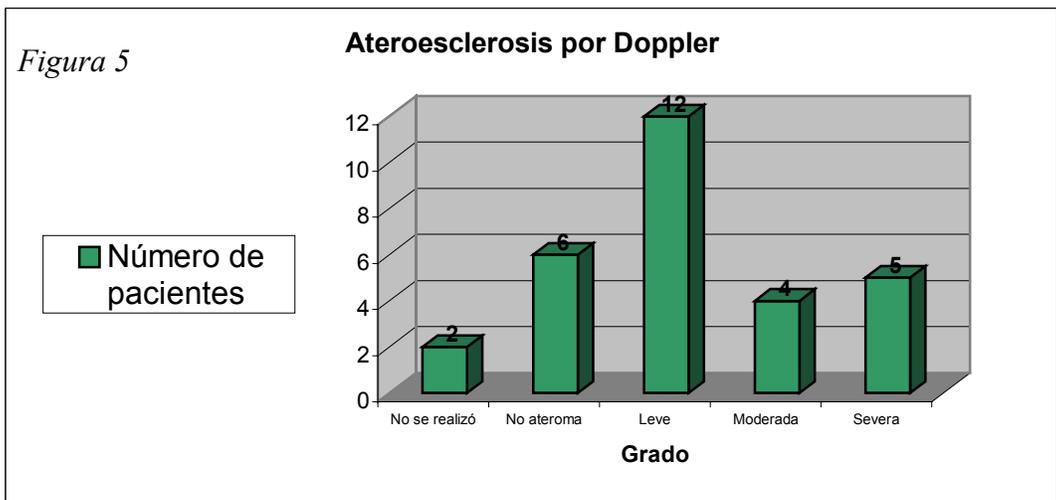


El grado de funcionalidad de los pacientes, determinado mediante escala de Rankin y su frecuencia en la población estudiada se presenta en la figura 4.

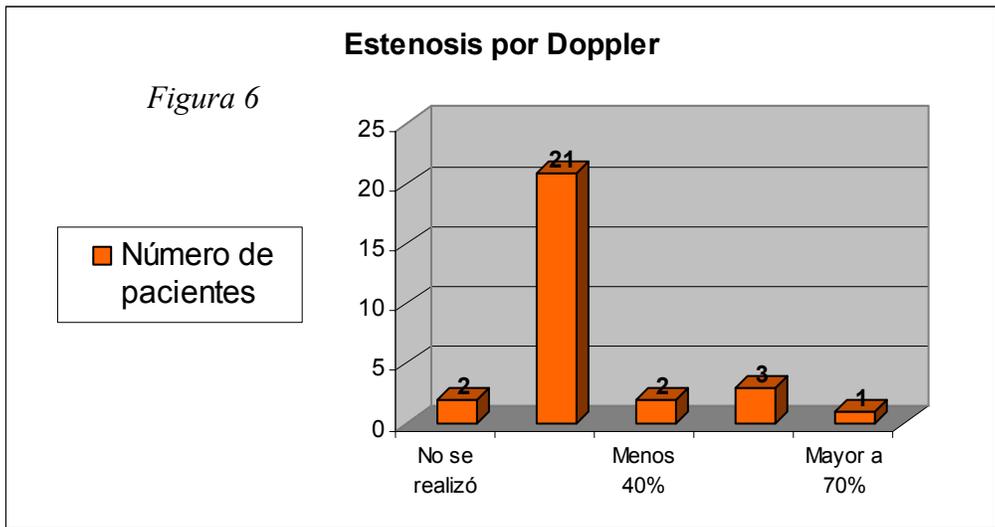


En la figura 5 se muestra el grado de aterosclerosis carotídea, determinado mediante Doppler.

Figura 5



En la figura 6 se muestra el grado de estenosis carotídea determinada por Doppler.



6.2. Medicamentos

De los 29 pacientes, 26 se encontraban en tratamiento con aspirina, 1 con clopidogrel y uno con ambos. 13 se encontraban con estatinas y 3 bezafibrato. En cuanto a antihipertensivos, los pacientes podían tomar más de uno: 8 ingerían captopril y 4 otros IECAS, 3 con bloqueadores de receptores de angiotensina 2, 7 con amlodipino

y 3 con otros calcioantagonistas. 2 pacientes se encontraban en manejo con DFH por epilepsia. 8 tomaban hipoglucemiantes orales (1 paciente se trataba solo con dieta).

6.3. Subgrupos de estudio.

Con el fin de evaluar el impacto de las diferentes variables en la presencia de enfermedad lacunar multiinfarto, así como en el pronóstico, se dividió al grupo de estudio en 2 ocasiones. Primero, en los pacientes que presentaban solo 1 infarto lacunar en los estudios de imagen versus los pacientes que presentaban enfermedad multiinfarto. Se realizó un análisis de Chi cuadrada con las variables estudiadas, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3. La otra división del grupo de estudio fue entre aquellos pacientes con Rankin de 0 a 2 los que se les definió como “buen pronóstico” y mayores a 3 como “mal pronóstico” (tabla 4).

Tabla 3. Infarto único versus múltiple

Característica	Infarto único (14)	Múltiples infartos (15)	P	OR	IC 95%
Sexo (M/F)	6/8	11/4	.096	3.667	.771-17.429
Tabaquismo	5	9	NS	-	-
Alcoholismo	4	7	NS	-	-
Cardiopatía	0	4	.037	.440	.283-.685
Diabetes Mellitus	5	4	NS	-	-
Hipertensión arterial	9	12	NS	-	-
Ateroescclerosis	0	5	NS	-	-
Estenosis	0	1	NS	-	-
Mal pronóstico	1	7	.017	.088	.009-.853
Leucoaraiosis	1	5	.082	6.5	.652-64.824
Hiperhomocisteinemia ayuno	2	3	NS	-	-
Hiperhomocisteinemia post-metionina	11	11	NS	-	-
Folato bajo	1	2	NS	-	-
B12 baja	0	1	NS	-	-

Tabla 4. Mal pronóstico versus buen pronóstico

Característica	Mal pronóstico (8)	Buen pronóstico (21)	P	OR	IC
Sexo (M/F)	6/2	11/10	NS	-	-
Tabaquismo	3	11	NS	-	-
Alcoholismo	4	7	NS	-	-
Cardiopatía	2	2	NS	-	-
Diabetes Mellitus	4	5	NS	-	-
Hipertensión arterial	7	14	NS	-	-
Aterosclerosis	4	1	.041	-	-
Estenosis	2	0	.044	-	-
Infarto único	1	13	.017	.088	.009-.853
Leucoaraiosis	3	3	NS	-	-
Hiperhomocisteinemia ayuno (+12)	2	3	NS	-	-
Hiperhomocisteinemia post metionina (+17)	6	16	NS	-	-
Folato bajo	1	2	NS	-	-
B12 bajo	0	1	NS	-	-

7. DISCUSION

Nuestros hallazgos, en relación a los factores de riesgo vascular, para infarto lacunar correlacionan con aquellos reportados en la literatura, como lo son hipertensión arterial, que reportamos en 72.4% (58-97%), diabetes mellitus 31% (11-29%), cardiopatía 13.8 % (hasta el 24%) y tabaquismo 48.3% (28 a 68%). De la misma manera nuestra serie tiene una diferencia en relación al sexo, con 58.6% de hombres, lo cual también ha sido reportado en la literatura (29-31).

Aunque encontramos 11 casos (37.9%) con sobrepeso y 6 (20.7%) con obesidad, no hallamos relación entre el índice de masa corporal y el pronóstico y/o la presencia de enfermedad multiinfarto.

No encontramos una asociación entre el índice tabáquico y la presencia de enfermedad multiinfarto, un peor pronóstico o con niveles incrementados de homocisteína. Si bien se conoce que el tabaquismo incrementa los niveles de homocisteína, requerimos para este aspecto complementar nuestro estudio con un grupo control, debido a que recientemente, se ha encontrado que a mayores niveles de homocisteína, es mayor el riesgo a padecer un infarto cerebral (32).

En cuanto a los lípidos, las medias en el grupo de estudio, se mantuvieron cerca de los límites de normalidad: 203 para colesterol total (deseable <200, alto >240), LDL 122.89 (<130 normal), HDL 41.32 (41 a 85), sin embargo con evidente hipertrigliceridemia: 197.84 (35 a 160). La cantidad de casos con colesterol total elevado fue de 4, con HDL bajo de 14, LDL alto de 11 y triglicéridos elevados de 16, lo cual evidencia el problema de dislipidemia en los pacientes estudiados, sin embargo, nuevamente, ninguna de las alteraciones anteriores tenía efecto en la presencia de mayor cantidad de infartos o en un mal pronóstico. Se realizó prueba de t-student para estas variables, que sugirió la relación entre elevación de LDL y triglicéridos, para la presencia de enfermedad multiinfarto, así como la disminución de los niveles de HDL. Sin embargo no reportamos en los resultados, por considerar que el tamaño de muestra aún es pequeño para la realización de dichos análisis y sería deseable hacerlo comparativo con un grupo control.

Al dividir al grupo de estudio, entre aquellos que presentaban infarto único versus infartos múltiples, encontramos, que el antecedente de cardiopatía en el paciente, implica un mayor riesgo para la presencia de múltiples infartos lacunares, quizá como un indicador de aterosclerosis generalizada. Este hallazgo correlaciona además con reportes de la literatura que muestran hiperhomocisteinemia en pacientes con enfermedad coronaria previa, que desarrollan eventos vasculares (33). De la misma manera es congruente el hallazgo de una asociación entre la presencia de enfermedad multiinfarto y un mal pronóstico en los pacientes.

Se encontró una tendencia de que la presencia de leucoaraiosis sea indicativa de enfermedad multiinfarto, sin embargo la p fue marginal y los intervalos de confianza encontrados son extremadamente amplios. De igual manera el sexo masculino parece tener una mayor incidencia de infartos múltiples, sin embargo no alcanzó esto último significancia estadística.

Por otro lado también existe una tendencia entre el pronóstico del paciente y la presencia de enfermedad carotídea aterosclerótica, lo cual, puede resultar igualmente de que ambas dependen de la presencia de los mismos factores de riesgo. Se encuentran descritos en la literatura, estudios que muestran asociación entre niveles de homocisteína y la presencia de estenosis carotídea (22, 23), nuevamente se sugiere a esta molécula como un marcador de enfermedad aterosclerótica.

En el grupo en general, 5 pacientes resultaron con hiperhomocisteinemia, en la determinación basal, y 22 posterior a la administración de carga de metionina, sin embargo, no logramos demostrar una relación entre la presencia de hiperhomocisteinemia y un peor pronóstico, ni tampoco un mayor número de lesiones vasculares en los estudios de imagen. Tampoco logramos establecer la presencia de hipovitaminosis en la población de pacientes con infarto lacunar del Instituto (solo en 1 paciente se logró encontrar niveles bajos de folato y en 3 niveles bajos de B12), ni se logró correlacionar los niveles menores de folato y B12 con incremento en los niveles de homocisteína sérica.

Al realizar una prueba de t-student para infarto único versus múltiple, se observó que la homocisteína en ayuno guardaba relación con la presencia de enfermedad

multiinfarto, con una p de .048, sin embargo por las razones anteriormente expresadas, no mostramos los datos de manera completa.

Se requiere completar el estudio analizando un grupo control, conformado por sujetos pareados por edad y sexo que no tengan historia de eventos vasculares a nivel cerebral, lo cual se encuentra actualmente en curso.

Si bien, actualmente la homocisteína y otros marcadores de respuesta inflamatoria, se han correlacionado con diversos padecimientos vasculares (34), el papel que tienen las vitaminas en estos padecimientos esta aún por definirse, ya sea de manera independiente (35) o su relación con el metabolismo de la homocisteína. Parece claro que la hiperhomocisteinemia representa un factor de riesgo vascular (36, 37), tanto a nivel cardiaco, como a nivel cerebral, incluso puede representar un marcador de aterosclerosis sistémica (33), así como de infartos silentes (19, 20), recurrencia de infarto (38) y trombos auriculares (39)

8. CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos correlacionan con los reportados en la literatura, en relación a la presencia y proporción de los diferentes factores de riesgo para enfermedad vascular cerebral.

En el presente estudio encontramos niveles incrementados de homocisteína en ayuno, y de manera mas notoria posterior a la administración de una carga de metionina, sin embargo no podemos logramos establecer que la hiperhomocisteinemia correlacione con un peor pronóstico funcional o una enfermedad vascular mas severa.

No logramos demostrar que en la población de pacientes que acude al instituto, la hipovitaminosis constituya un cofactor en los niveles de homocisteína, y por tanto en la presencia de eventos vasculares.

Debe completarse la realización del estudio, a fin de lograr contar con un grupo control, sin enfermedad vascular cerebral, y de este modo establecer de una mejor manera el papel de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo vascular en nuestra población.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Barinagarrementeria F, Cantu C. Enfermedad Vascular Cerebral. McGraw-Hill Interamericana. 2ª edición.
- 2) Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *New Engl J Med* 1998;388(15):1042-50
- 3) Graham I. Homocysteine in Health and Disease. *Ann Intern Med* 1999;131:387-8
- 4) Kang SS, Zhou J, Wong PWK, et al. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *AM J Hum Genet* 1988;43:414-21
- 5) Boushey CJ, Berford SA, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1998;274:1049-57
- 6) Ross R, Atherosclerosis. An inflammatory Disease. *New Engl J Med* 1999;340(2):115-26
- 7) Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *New Engl J Med* 1991;324:1149-55
- 8) Kullo I J, Gau G, Tajik J. Novel Risk Factors for Atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2000;75:369-80
- 9) Eikelboom. J W, Lonn E, Genest Jr J, Hankey G, Yusuf S. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131:363-75
- 10) Cleophas T J, Hornstra N, van Hoogstraten B, van der Meulen J. Homocysteine, a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. *Am J Cardiol* 2000;86(9):1005-9.
- 11) Ridker P M, Stampfer M J, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein, and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001;285:2481-5
- 12) Stampfer M, Malinow R. Can lowering homocysteine levels reduce cardiovascular risk? *N Engl J Med* 1995;332:328-9
- 13) Caso V, Cardaioli G, Gallai V, Parnetti L. Vertebral artery dissection and hyperhomocysteinemia: a case report. *Cerebrovasc Dis* 2000;10(suppl 4):9-10

- 14) Gallai V, Caso V, Paciaroni M, Cardaioli G, Arning E, et al. Mild hyperhomocysteinemia. A possible risk factor for cervical artery dissection. *Stroke* 2001;32:714-8
- 15) Pezzini A, Del Zotto E, Archetti S, Negrini R, Bani P. Plasma homocysteine concentration, C677T MTHFR genotype, and 844ins68bp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and atherothrombotic stroke. *Stroke* 2002;33:664-9
- 16) Evers S, Koch HG, Grottemeyes KH, Lange B, Deufel T, Erich Bernd R. Features, symptoms, and neurophysiological findings in stroke associated with hyperhomocysteinemia. *Arch Neurol.* 1997;54:1276-82
- 17) Madonna P, de Stefano V, Coppola A, Cirillo F, Cerbone A M, et al. Hyperhomocysteinemia and other inherited prothrombotic conditions in young adults with a history of ischemic stroke. *Stroke* 2002;33:51-6
- 18) Kristensen B, Malm J, Nilsson T K, Hulldin J, Carlberg B, et al. Hyperhomocysteinemia and hypofibrinolysis in young adults with ischemic stroke. *Stroke* 1999;30:974-80.
- 19) Matsui T, Arai H, Yuzuriha T, Yao H, Miura M, et al. Elevated plasma homocysteine levels and risk of silent brain infarction in elderly people. *Stroke* 2001;32:1116-9
- 20) Vermeer S, den Heijer T, Koudstaal P, Oudkerk M, Hofman A, et al. Incidence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam scan study. *Stroke* 2003;34:392-6
- 21) Howard V, Sides E G, Newman G C, Cohen S N, Howard G, et al, et al. Changes in plasma homocysteine in the acute phase after stroke. *Stroke* 2002;33:473-8
- 22) Selhub J, Jacques P, Bostom A, D'Agostino R, Wilson P. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995;332:286-91
- 23) Streifler J Y, Rosenberg N, Chetrit A, Eskaraev R, Sela B A, et al. Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1 (Leu33Pro) polymorphism. *Stroke* 2001;32:2753-8
- 24) Yoo J H, Chug C S, Kang S S. Relation of plasma homocysteine to cerebral infarction and cerebral atherosclerosis. *Stroke* 1998;29:2478-83
- 25) Eikelboom J, W, Hankey G J, Anand S S, Lofthouse E, Staples N, Baker R. Association between high homocysteine and ischemic stroke due to large and

- small artery disease but not other etiologic subtypes of ischemic stroke. *Stroke* 2000;31:1069-75
- 26) Sasaki T, Watanabe M, Nagai Y, Hoshi T, Takasawa M, Nukata M, et al. Association of plasma homocysteine concentration with atherosclerotic carotid plaques and lacunar infarction. *Stroke* 2002;33:1493-6
 - 27) Kelly P.J., Rosand J, Kistler J P, Shih V E, Silveira BA, et al. Homocysteine, MTHFR 677C → T polymorphism, and risk of ischemic stroke. *Neurology* 2002;59:529-3
 - 28) Adams H P, Bendixen B H, Kappelle J, Biller J, Loer B B, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke* 1993;24:35-41
 - 29) Tuszynki MH, Petito C, Levy D. Risk factor and clinical manifestations of pathologically verified lacunar infarctions. *Stroke* 1989;20:990-9
 - 30) Arboix A, Marti-Vilalta J, Garcia J. Clinical study of 227 patients with lacunar infarcts. *Stroke* 1990;21:842-7
 - 31) Mast H, Thompson J, Lee S, Mohr J, Sacco R. Hypertension and diabetes mellitus as determinants of multiple lacunar infarcts. *Stroke* 1995;26:30-3
 - 32) Fallon U, Virtamo J, Young I, McMaster D, Ben-Shlomo Y, Wood N. Homocysteine and cerebral infarction in Finnish Male Smokers. *Stroke* 2003;34:1359-63.
 - 33) Tanne D, Haim M, Goldbourt U, Boyko V, Doolman R, et al. Prospective study of serum homocysteine and risk of ischemic stroke among patients with preexisting coronary heart disease. *Stroke*. 2003;34:632-6
 - 34) Ridker P, Hennekens C, Buring J, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342:836-43
 - 35) Kelly P, Shih V, Kistler P, Barron M, Lee H, et al. Low vitamin B6 but not homocysteine is associated with increased risk of stroke and transient ischemic attack in the era of folic acid grain fortification. *Stroke* 2003;34:e51-e54
 - 36) Bostom A, Rosenberg I, Silbershatz H, Jacques P, Selhub J, et al. Nonfasting plasma total homocysteine and stroke incidence in elderly persons: the Framingham study. *Ann Intern Med* 1999;131:352-5
 - 37) Li Z, Sun L, Zhang H, Liao Y, Wang D, et al. Elevated plasma homocysteine was associated with hemorrhagic and ischemic stroke, but methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism was a risk factor for thrombotic stroke. *Stroke* 2003;34:2085-90

- 38) Boysen G, Brander T, Christensen H, Gideon R, Truelsen T. Homocysteine and risk of recurrent stroke. *Stroke* 2003;34:1258-61
- 39) Ay H, Arsava M, Tokgözoğlu L, Özer N, Saribas O. Hyperhomocysteinemia is associated with the presence of left atrial thrombus in stroke patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Stroke* 2003;34:909-12

10. Anexo

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PROTOCOLO DE INVESTIGACION HOMOCISTEÍNA Y VITAMINAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PEQUEÑO Y GRANDES VASOS

1. Se me ha invitado a participar en el protocolo de investigación niveles de homocisteína, cianocobalamina, piridoxina y ácido fólico en pacientes con enfermedad de pequeño vaso o enfermedad carotídea que se realiza en el Departamento de Neurogenética junto con la clínica de Enfermedad Vascul ar Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
2. En éste protocolo trabajan: Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela, Q.F.B. Aurelio Jara Prado, Q.F.B. Ma de los Angeles Fernández Aguilar, Dr. Antonio Arauz Góngora, Dra. Yolanda Aburto, Dr. Claudio Alberto García Perales
3. Estoy enterado(a) de que el objeto de la investigación es determinar los niveles en mi sangre de unas sustancias llamadas: homocisteína, la cual se ha encontrado que cuando está elevada puede ser un factor de riesgo para desarrollar infartos cerebrales. Así como determinación de niveles de cianocobalamina, piridoxina y ácido fólico, que son vitaminas.
4. Estoy enterado(a) que cuando la homocisteína está elevada en la sangre puede disminuirse ingiriendo cianocobalamina, piridoxina y ácido fólico.
5. Estoy enterado(a) de que si tengo niveles altos de homocisteína y deseo que se me receten vitaminas para disminuirlos, se me indicará la forma en que debo tomarlas.
6. Estoy enterado(a) de que se me tomará una muestra de 20ml de sangre en ayunas, después de la cual tomaré un vaso de jugo de naranja, con una sustancia llamada metionina, que es un aminoácido que normalmente ingiero en diversos alimentos y 4 horas después se me tomará una nueva muestra de 5 ml de sangre.
7. Estoy enterado(a) que la muestra de sangre que me tomen una parte se utilizará para extraer DNA, que es el material hereditario, el cual podrá usarse únicamente en éste proyecto de investigación.
8. Estoy enterado(a) de que las personas que tomarán la muestra de sangre están entrenados para hacerlo y que el material que se usará para hacerlo es desechable.
9. Estoy enterado(a) de que los resultados del estudio son confidenciales y solamente yo recibiré información acerca de ellos.
10. Acepto participar en forma voluntaria en éste protocolo.

Fecha _____

Nombre y firma del paciente _____

Nombre y firma del testigo _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Dr. Claudio Alberto García Perales

Tel. 044-55-1234-7731