



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EFEECTO DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL
ALTAMENTE EFECTIVA (HAART)
SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA
DE HOMOCISTEINA EN PACIENTES CON SIDA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

ERIKA CORIA RAMÍREZ

TUTOR:

DR. ABRAHAM MAJLUF CRUZ



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Genética de la Nutrición. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Nacional de Pediatría. Por facilitar el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

A Isabel Ibarra por su apoyo como Asesor Técnico en la determinación de Homocisteína.

DEDICATORIA

A MIS PADRES por su invaluable apoyo, cariño y comprensión

**A Miguel Angel, mi esposo, por apoyarme en la culminación de esta tesis y
brindarme siempre su amor**

A mis hermanos por su compañía en las buenas y en las malas

Al Dr. Abraham Majluf por confiar en que podría lograrlo

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
Enfermedad ocasionada por el VIH y SIDA	7
Tratamiento antirretroviral	9
Terapia Antirretroviral Altamente Efectiva	10
Enfermedad tromboembólica en pacientes con SIDA	13
Hiperhomocistinemia	14
Hiperhomocistinemia en pacientes con SIDA	23
JUSTIFICACIÓN	25
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
PACIENTES Y MÉTODOS	29
A. Universo de trabajo	29
B. Tipo de estudio	29
C.1. Criterios de inclusión	29
C.2. Criterios de no inclusión	29
C.3. Criterios de exclusión	30
D. Selección de la muestra	30
E. Descripción de variables	31
F. Definición de las variables	31
G. Grupos de estudio	32
H. Procedimiento	32

Determinación de Hcy por HPLC	33
Determinación de ácido fólico	34
Determinación de vitamina B12	35
I. Análisis estadístico	36
CONSIDERACIONES ÉTICAS	37
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	53
PERSPECTIVAS	54
BIBLIOGRAFIA.	55
ANEXOS	60
Hoja de recolección de datos	60
Hoja de información para participar en el estudio	61
Carta de consentimiento informado	63

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANNRT	Análogo no nucleósido de la transcriptasa reversa.
ANRT	Análogo nucleósido de la transcriptasa reversa
ARN	Ácido ribonucleico
ARV	Antirretroviral
CBS	Cistationina- β -sintasa
CLISIDA	Clínica de SIDA
COM	Carga oral de metionina
DE	Desviación estándar
DTE	Ditioetriol
EDTA	Etilendiamino tetraacetato sódico
EOR	Especies reactivas de oxígeno
HAART	Terapia antirretroviral altamente efectiva
Hcy	Homocisteína
HGR	Hospital General Regional
HHC	Hiperhomocistinemia
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Inhibidores de proteasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Lp (a)	Lipoproteína (a)
MTHF	Metiltetrahidrofolato
MTHFR	Metiltetrahidrofolato reductasa
OPA	Oftaldialdehído
PC	Proteína C
PS	Proteína S
SAM	S-adenosil metionina
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
tHcy	Homocisteína total
TR	Transcriptasa reversa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

EFFECTO DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE EFECTIVA (HAART) SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HOMOCISTEÍNA EN PACIENTES CON SIDA.

INTRODUCCIÓN. El tratamiento antirretroviral utilizado en el SIDA ha avanzado enormemente desde la aparición de esta epidemia. Con la generación de los inhibidores de la proteasa del VIH han sucedido cambios muy importantes en la evolución y pronóstico de estos enfermos ya que la historia natural de la infección se ha detenido; al iniciar la terapia antirretroviral altamente efectiva (HAART), la carga viral disminuye rápidamente e incrementa la cuenta de células CD4. Sin embargo, la HAART ha permitido que se presenten complicaciones no observadas previamente, por ejemplo, la trombosis arterial y venosa. Aunque existen varias causas que suscitan los fenómenos tromboticos, en nuestro medio no hay una explicación para la mayoría de estas complicaciones. La hiperhomocistinemia plasmática (HHC) es considerada un factor independiente de riesgo trombotico, sin embargo, no existen reportes de la prevalencia de HHC en los pacientes con SIDA y tampoco se ha reportado si existe asociación entre el tratamiento antirretroviral e HHC.

JUSTIFICACION. En la CLISIDA del Hospital Gabriel Mancera describimos una de las series de enfermedad tromboembólica venosa más grandes del mundo. Debido a que la HHC está fuertemente asociada con trombosis arterial y venosa, era necesario analizar este factor protrombotico en la población con infección por VIH, una asociación que ayudaría a explicar por lo menos en parte la etiología de estas complicaciones en esta población.

OBJETIVOS. Conocer si el uso de HAART en pacientes con SIDA induce la aparición de HHC. Establecer si existe correlación entre HHC y la caída en la concentración plasmática de ácido fólico, vitamina B6 o vitamina B12 en el paciente con SIDA que inicia HAART.

MATERIALES Y MÉTODOS. Realizamos un estudio observacional, prospectivo, descriptivo, de diseño antes-después. Se incluyeron 70 pacientes consecutivos con SIDA de ambos sexos y que iniciaban HAART, todos ellos mayores de 18 años. Los pacientes con insuficiencia renal aguda o crónica o hepática, con expectativa de vida menor a 3 meses, con una neoplasia asociada o infección oportunista grave, mujeres embarazadas, y los portadores de una enfermedad que provoca HHC fueron excluidos. Estudiamos un solo grupo de pacientes a los que se les tomaron 3mL de sangre en un tubo con EDTA en ayuno y luego de 8h de una carga oral de metionina (COM); el mismo procedimiento se realizó seis meses después de iniciar la HAART. Para la COM se administraron 100mg/Kg de peso de L-metionina diluidos en 200 mL de jugo de naranja a las 12:00 am y la muestra se tomó a las 8 am del día siguiente. La cuantificación de la Hcy plasmática se realizó por cromatografía líquida de alta resolución. Evaluamos en todos los pacientes la concentración sérica de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina B6 y analizamos la ingesta de fármacos que afectan la función renal o hepática, así como el esquema de tratamiento antirretroviral iniciado. Para la descripción de las características generales del grupo se utilizaron medidas de resumen así como de dispersión. Para determinar si los valores de Hcy, vitamina B6, vitamina B12 o ácido

fólico fueron estadísticamente diferentes antes de la HAART y luego de 6 meses del mismo, se utilizó la prueba de T pareada o la prueba de Wilcoxon de acuerdo a la distribución muestral. Para conocer la distribución muestral de las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Kolgomorov-Smirnov. La frecuencia de HHC se expresó en porcentaje, para obtener la significancia estadística se utilizó la prueba de χ^2 . Se utilizó ANOVA de dos factores para medidas repetidas para analizar la asociación entre variables. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$. El trabajo de investigación fue aprobado por el Comité Local de Investigación del Hospital Gabriel Mancera.

RESULTADOS. De los 70 pacientes incluidos 10 eran mujeres con edad promedio de 48 años (26-73) y 60 hombres con edad promedio de 37 años (20-63). Encontramos diferencias significativas en las concentraciones de Hcy en ayuno antes y después de 6 meses de tratamiento ARV, 7.92 (3.40) y 24.88 (14.63) $p < 0.001$, respectivamente. También encontramos diferencias significativas en las concentraciones de Hcy postCOM 9.02 (2.96) y 36.09 (16.17) $p < 0.001$, antes y después de tratamiento ARV respectivamente. La HHC en ayuno estuvo presente en 5.7% antes de la HAART en comparación con 80% después de iniciado el tratamiento ARV, $p < 0.0001$; así mismo, la HHC postCOM se presentó en 4.2% vs 98.5%, antes y después del tratamiento ARV respectivamente, $p < 0.0001$. No encontramos diferencias significativas en las concentraciones de vitamina B12 y B6 antes y después de la HAART. Encontramos diferencias significativas en las concentraciones de ácido fólico antes y después del tratamiento ARV, 5.89 (2.31) y 4.96 (1.51), respectivamente $p = 0.01$; sin embargo, ningún paciente presentó valores menores de lo normal. En cuanto al tratamiento ARV, no se observó diferencia significativa entre los pacientes bajo un esquema con inhibidor de proteasa vs los pacientes bajo esquema sin inhibidor.

CONCLUSIONES. La HHC tanto en ayuno como después de una COM está asociada a la HAART, sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que este efecto se presenta, ya que no es debido a alteraciones en la concentración de vitamina B6, B12 o ácido fólico. Aunque este efecto se aprecia en ambas vías metabólicas, el efecto más intenso se observa postCOM, lo que sugeriría alteraciones en la vía de la transulfuración.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad por el VIH y SIDA.

La pandemia actual de infección por VIH/SIDA es mayor del 50% que las predicciones formuladas hace 10 años. Hacia el año 2000 ya 36 millones de personas vivían con el VIH/SIDA de los cuales, 25 millones vivían en África, continente en el que hoy residen 70% de los adultos y 80% de los niños que viven con SIDA en el mundo. Hasta 95% de todos los pacientes infectados con el VIH viven en países en desarrollo. El SIDA ha provocado la muerte de 22 millones de personas; sólo en el año 2000, 3.0 millones de personas murieron por la enfermedad y ocurrieron globalmente 15,000 nuevos contagios por día con un estimado de 5.3 millones de nuevas infecciones. En América Latina y el Caribe más de 200,000 personas fueron infectadas en el año 2000, siendo la prevalencia más alta en América Central y el Caribe (1).

Con la identificación del VIH como agente etiológico del SIDA y con la disponibilidad de pruebas diagnósticas más sensibles y específicas para el diagnóstico, la definición del SIDA ha sufrido varias modificaciones, la última se encuentra vigente desde 1993, año en el que los Centros para el Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos propusieron una clasificación basada en el cuadro clínico ocasionado por la infección viral y en la cuenta de linfocitos T CD4+ en sangre. Dicha clasificación es aplicable para adolescentes y adultos. El sistema tiene tres grupos de acuerdo a la cuenta de linfocitos T CD4+ y tres categorías clínicas, lo que conforma una matriz de 9 categorías excluyentes. En base a este sistema, un paciente infectado con el VIH y con <200 linfocitos T CD4+/ μ L tiene, por definición SIDA, independientemente de que tenga o no síntomas de enfermedades

oportunistas. Una vez que un paciente entra en la categoría B, no puede volver a la categoría A, aún si el cuadro cede; lo mismo sucede con las categorías C y B (2).

En la etapa A el paciente generalmente se encuentra asintomático, pudiendo presentar en las primeras 2-4 semanas de la infección un síndrome retroviral agudo, el cual es inespecífico y consiste en fiebre, adenopatías, erupciones cutáneas maculopapulares y ataque al estado general. Las manifestaciones clínicas de la etapa B consisten en neumonía comunitaria, tuberculosis pulmonar, candidiasis vaginal u orofaríngea, herpes urogenital o zoster y diarreas autolimitadas. En la etapa C se presentan infecciones por citomegalovirus, criptococos, toxoplasma, micobacterias del complejo *avium*, histoplasma, candidiasis en esófago, tráquea y pulmones, neumonías de repetición, neumonía por *Pneumocystis carinii*, entre otras, los pacientes también pueden presentar cáncer cervicouterino invasivo, linfoma cerebral o no-Hodgkin, sarcoma de Kaposi, demencia y síndrome de desgaste asociada a VIH (3).

CATEGORÍAS CLÍNICAS			
Linfocitos T CD4+	A	B	C
Categorías	Asintomático, aguda (primaria) VIH o LGP*	Sintomático Cuadros no A ni C	Cuadros definitorios de SIDA
500/ μ L	A1	B1	C1
200-499/ μ L	A2	B2	C2
<200/ μ L	A3	B3	C3

Las áreas sombreadas indican la definición de caso de vigilancia extendida del SIDA. *LGP: linfadenopatía generalizada persistente.

Tratamiento antirretroviral (ARV).

El tratamiento ARV del SIDA ha tenido avances enormes desde la aparición de esta epidemia. El surgimiento de los inhibidores de la proteasa del VIH (IPs) cambió significativamente la evolución y pronóstico de estos enfermos debido a su excelente efecto ARV (4). El tratamiento ARV se basa en la biología misma del VIH. Éste se introduce en las células blanco al fusionar su glicoproteína de superficie, gp120, con el receptor CD4 de la membrana linfocítica (5); inhibir esta fusión es ya una alternativa terapéutica. La TR es otro blanco terapéutico; sus inhibidores análogos nucleótidos (ANTRs) (zidovudina, didanosina, dideoxicitidina, lamivudina, stavudina), son ejemplos de estos medicamentos. Después de entrar en la célula, estos análogos requieren convertirse en su forma activa como trifosfatos por medio de cinasas intracelulares (6). Estos dideoxinucleótidos se incorporan en la cadena transcrita del DNA viral causando la finalización temprana de la cadena (7). Los inhibidores no nucleótidos de la TR (ANNTRs) (nevirapina, delavirdina) se unen directamente a la TR en puntos diferentes de aquéllos donde se unen los análogos nucleótidos, causando la inhibición de la enzima mediante cambios alostéricos (8). El ARN viral codifica una gran poliproteína, la cual debe fragmentarse para obtener proteínas activas y mantener viable la replicación viral. La inhibición de esta proteasa por medicamentos como el saquinavir, ritonavir o indinavir, culmina en la producción de partículas virales defectuosas e inmaduras (9,10).

Actualmente, el tratamiento ARV consiste en por lo menos tres drogas: uno o dos IPs o un ANNTR combinado con dos ANTRs (11), ya que están demostradas las ventajas de la terapia combinada sobre la monoterapia (12-15). Además de que las combinaciones potencian los efectos ARV, hacen que las cepas virales requieran múltiples mutaciones simultáneas para generar resistencia farmacológica. Sin embargo, los costos y efectos adversos de estos esquemas (ANTRs + IP), dificultan su uso generalizado y la adherencia al tratamiento (16).

Terapia Antirretroviral Altamente Efectiva.

La terapia antirretroviral altamente efectiva (HAART, por sus siglas en inglés) ayuda a disminuir rápidamente la concentración plasmática de ARN viral (carga viral), así como a incrementar gradualmente la cuenta de CD4s, a veces, hasta niveles normales (17). El número de CD4s de memoria aumenta después de un tratamiento efectivo debido a la redistribución linfóide hacia la circulación. Los linfocitos CD4+ vírgenes, esenciales en la respuesta a nuevos antígenos, se restablecen gradualmente durante la supresión efectiva de la replicación viral. En muchos pacientes que no han recibido aún tratamiento ARV, los CD4s aumentan hasta niveles en los que el paciente ya no es susceptible a las infecciones oportunistas (18).

Tabla 1. Recomendaciones para iniciar la terapia ARV en individuos que no han recibido antes tratamiento.

TIPO DE ENFERMEDAD	RECOMENDACIÓN
Enfermedad sintomática por VIH	Tratamiento recomendado
Enfermedad asintomática por VIH, </=200 CD4s/ μ L	Tratamiento recomendado
Enfermedad asintomática por HIV >/=200 CD4s/ μ L	La decisión de iniciar tratamiento debe individualizarse; las recomendaciones se basan en: <ul style="list-style-type: none"> - Cuenta de CD4s y frecuencia de disminución¹. - Concentración del RNA del VIH en plasma². - Interés del paciente para adherirse a la terapia. - Evaluación del riesgo de toxicidad e interacciones medicamentosas

1. Algunas guías utilizan una cuenta de CD4s = 350/ μ L para iniciar la terapia; una frecuencia alta de disminución de CD4s es >100/ μ L/año. 2. Un nivel alto de RNA del VIH es >50,000-100,000 copias/mL. La frecuencia de las mediciones de los CD4s antes que el tratamiento inicie se puede guiar por el nivel de RNA del HIV.

La duración del primer régimen de tratamiento depende de su adherencia, tolerabilidad y conveniencia, así como de la carga viral y el estado inmunológico. Los fármacos de vida media prolongada y los que no interfieren con la hidratación y la comida parecen ventajosos. Los efectos adversos diarios, aunque pequeños, reducen la adherencia. Los fármacos con efectos tóxicos a plazo largo son una causa importante para que el paciente rehúse tomar el tratamiento (Tabla 2) (19).

Tabla 2. Efectos tóxicos y complicaciones de la terapia ARV.

TOXICIDAD/DEFINICION	ETIOLOGIA/ASOCIACION CON FARMACOS
Acidemia láctica Asintomática (5-10 mmol/L) Sintomática (>10 mmol/L)	Causada por ANTRs
Anormalidades en los lípidos Aumento de triglicéridos y del colesterol LDL	Asociado a todos los IPs (más con ritonavir) Asociación con los ANNTRs
Intolerancia a la glucosa Resistencia a la insulina Diabetes tipo 2	Se sugiere la asociación con IPs
Anormalidades en la composición de la grasa corporal	Se ha descrito con los IPs
Hepatitis/hepatotoxicidad	Se asocia con todos los ARVs. La coinfección con el virus de la hepatitis B o C incrementa el riesgo
Desmineralización ósea y necrosis avascular	La asociación no es aún clara
Hipersensibilidad al fármaco	Asociada a todos los ANNTRs

El apego incompleto a uno o más de los fármacos prescritos es la principal causa de falla en el régimen ARV (20). La carga viral se duplica por cada disminución del 10% en el cumplimiento del tratamiento ARV (21). Los factores que limitan el apego son complejos y están definidos incompletamente pero podrían incluir el alto número de tabletas, su tamaño, las restricciones en la dieta, los efectos adversos y una educación poco efectiva del médico al paciente (18).

En el individuo asintomático, la actividad ARV se evalúa por los cambios en la cuenta de CD4s y la carga viral. La disminución de la carga viral y el aumento en los CD4s en respuesta a la terapia ARV se asocian a la eficacia clínica (22-24). Frecuentemente, la cuenta de CD4s aumenta >50 células/ μ L en 4 a 8 semanas luego de iniciar el tratamiento ARV para luego elevarse adicionalmente entre 50-100 células/ μ L/año. Los métodos que

miden el RNA del VIH tienen límites de detección de 50 copias/mL y la cuantificación comercial es confiable hasta 200 copias/mL. Con mediciones repetidas, las diferencias de 0.2 a 0.3 \log_{10} (30-50%) se consideran un cambio significativo en la carga viral. El HAART generalmente reduce la carga viral en >90% (1 $-\log_{10}$ o reducción de 10 veces) en las primeras 8 semanas de tratamiento. Si no se alcanza el 90% de reducción a las 4 semanas de iniciado el tratamiento ARV es probable que se presente incumplimiento al tratamiento, resistencia viral o inadecuada exposición del fármaco (18).

Enfermedad tromboembólica en pacientes con SIDA.

La trombosis arterial o venosa es una complicación cada vez más frecuente en los pacientes con SIDA, dentro de los factores de riesgo cardiovascular secundarios al HAART se incluyen síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina y diabetes mellitus, todas ellas enfermedades crónicas inflamatorias productoras de daño endotelial y secundariamente aterosclerosis, lo que incrementa el riesgo de eventos cardiovasculares en esta población (25-27).

En un periodo de 42 meses, en la CLISIDA del Hospital General Regional Gabriel Mancera, se reportaron 34 casos de eventos trombóticos que ocurrieron en 28 pacientes. Se presentaron 31 casos de trombosis venosa profunda, 2 de tromboembolia pulmonar y una trombosis de la vena renal. Seis pacientes presentaron una segunda trombosis a pesar de que tres de ellos tenían tratamiento anticoagulante óptimo, un hecho que sugiere una condición trombofílica grave y permanente. No se registró ninguna trombosis arterial (28).

Las asociaciones más frecuentes que pueden explicar los fenómenos trombóticos son las concentraciones bajas de proteína S (PS) (29-31), infección por citomegalovirus (32-34), deficiencia adquirida de proteína C (PC) (29), uso de acetato de megestrol (35,36), nutrición parenteral (37), deficiencia adquirida del cofactor II de la heparina (38), hipofibrinólisis (39), presencia de anticoagulante lúpico (40-42) y disfunción endotelial (43-45). En el estudio realizado en la CLISIDA del Hospital General Regional Gabriel Mancera se encontró deficiencia de PS, PC y anticoagulante lúpico en 32, 7 y 7% de los pacientes, respectivamente. Ningún paciente tenía infección por citomegalovirus o recibía nutrición parenteral. Nueve pacientes recibían acetato de megestrol aunque éste se utilizó en 183 de 600 pacientes antes de la era de los IPs sin que se observara ninguna trombosis. No se encontró ninguna anomalía trombofílica en 15 pacientes (29).

Los resultados de este trabajo sugieren que los fármacos ARV pueden tener alguna participación en la génesis de la trombosis venosa. Es probable que los inhibidores de proteasa disminuyan la regulación del sistema anticoagulante, que tengan algún efecto inductor de disfunción plaquetaria o endotelial o que incrementen alguna condición trombofílica subyacente (29).

Hiperhomocisteinemia (HHC).

La enfermedad vascular trombótica constituye la principal causa de morbimortalidad en la mayor parte del mundo y nuestro país no es la excepción. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento y prevención de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales: hiperlipidemia, tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión arterial, la inactividad física. Sin

embargo, sabemos ahora que no son suficientes para explicar la alta prevalencia de enfermedad vascular ya que hasta 25% de los pacientes con enfermedad vascular prematura no tiene factores de riesgo bien establecidos (46). En 1996, la 27 Conferencia Bethesda enlistó nuevos factores de riesgo cardiovascular: hipertrofia ventricular izquierda, aumento de lipoproteína (a) (Lp(a)), hipertrigliceridemia, hiperfibrinogenemia e HHC (46,47). La HHC ha recibido gran atención recientemente ya que es un factor de riesgo independiente para aterosclerosis y tromboembolismo venoso (48,49). La elevación moderada de homocisteína (Hcy) en el plasma se presenta en 5 a 7% de la población general (50).

La Hcy es un aminoácido con un grupo sulfidrilo libre que se sintetiza a partir de la metionina, única fuente en el humano. La metionina es indispensable en la síntesis de proteínas, la formación de adenosilmetionina, la síntesis de Hcy y el producto final de su catabolismo es la formación de cisteína. Metabólicamente, la Hcy es importante en el reciclamiento del folato intracelular, el catabolismo de colina, betaína y en la formación de cistationina y cisteína (51). Aproximadamente, 70% de la Hcy plasmática circula unida a residuos de cisteína de las proteínas principalmente albúmina. La fracción no unida (30% de la Hcy total) es susceptible de oxidación a pH fisiológico y puede formar un homodímero (Hcy-Hcy) conocida como homocistina, o bien reaccionar con otros tioles, principalmente cisteína, para formar cisteína-Hcy, un heterodímero.

Una pequeña cantidad circula como disulfuro con proteína (Hcy-proteína). Existen menos de 3 $\mu\text{mol/L}$ de Hcy en forma reducida libre en plasma (51). Hcy es un término genérico que se utiliza para referirse a todas las especies de homocisteína; la suma de las formas libre y unida a proteínas se refiere como Hcy total (tHcy) (52,53). La Hcy se forma de la

metionina teniendo como intermediarios a la S-adenosilmetionina y a la S-adenosil-Hcy que se forman en presencia de la metionina adenosiltransferasa y de Hcy-metiltransferasa, respectivamente. La hidrólisis de S-adenosil-Hcy catalizada por la S-adenosilhomocistina-hidrolasa libera adenosina y produce finalmente Hcy (54-56). La Hcy no está presente en la dieta y sólo pequeñas cantidades se liberan de los tejidos al plasma; la excreción urinaria de Hcy es de 3.5-9.8 $\mu\text{mol/día}$ y está limitada debido a su unión a proteínas plasmáticas y a su alta reabsorción renal (56,57).

La Hcy tiene dos rutas metabólicas, la remetilación y la transulfuración (Figura 1). La primera regenera metionina y la segunda forma cisteína. En situaciones de balance negativo de metionina, la Hcy se metaboliza por remetilación para conservar metionina. En la mayoría de los tejidos, la Hcy es remetilada por la enzima metionina-sintasa, dependiente de vitamina B12 como cofactor y N-5-metiltetrahydrofolato (MTHF) como co-sustrato y donador de grupos metilo. Esta vía requiere folato y de la enzima metilen-tetrahydrofolato reductasa (MTHFR). Alternativamente, el grupo metilo puede ser donado por betaína que deriva de la colina la cual, a su vez, se obtiene de la dieta o se sintetiza en el organismo. Esta reacción está confinada al hígado y es independiente de vitamina B12; la enzima que cataliza esta reacción es la betaína-Hcy metil transferasa que se encuentra en hígado y riñón (56,58).

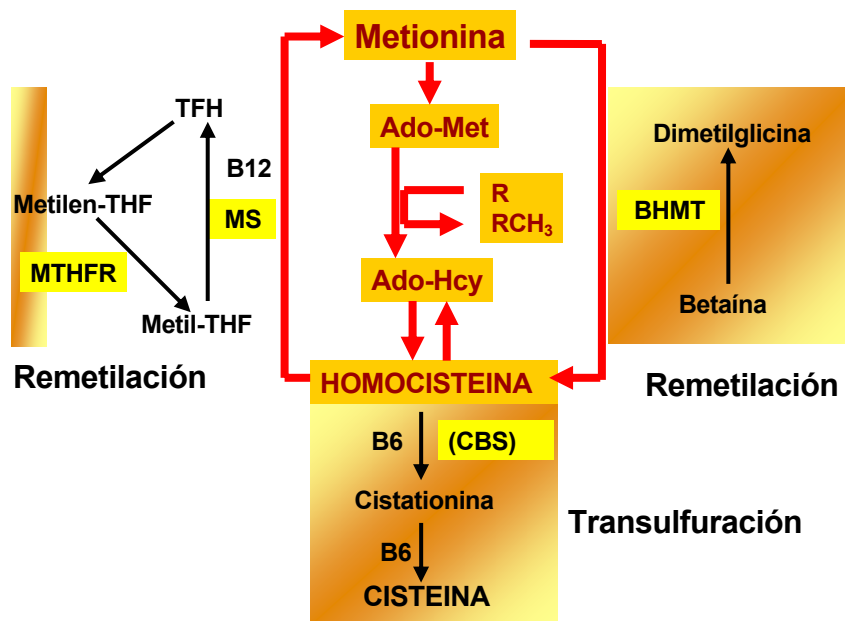


Figura 1. Metabolismo de la Hcy.

La vía de la transulfuración (Figura 1) se activa en situaciones en las que existe un exceso de metionina o cuando sus depósitos son adecuados; la Hcy se condensa con serina para formar cistationina, reacción irreversible catalizada por la enzima cistationina-B-sintasa (CBS), la cual requiere vitamina B6 como cofactor. Las enzimas de esta vía están en hígado, riñón, intestino delgado y páncreas siendo los únicos sitios donde se completa la transulfuración (51). Además sintetizar cisteína, la vía de la transulfuración es útil para catabolizar efectivamente el exceso de Hcy que no se requiere para transferir grupos metilo. Las alteraciones genéticas o adquiridas en cualquiera de las enzimas de las dos vías antes mencionadas o las deficiencias nutricionales de sus cofactores aumentan la Hcy plasmática, la dieta hipoproteica incrementa la remetilación y disminuye la transulfuración para conservar metionina. La concentración de S-

adenosilmetionina regula la remetilación para conservar grupos metilo en forma de metionina o para incrementar la transulfuración que forma cisteína cuando no se necesitan grupos metilo. El consumo continuo de betaína disminuye el nivel plasmático de Hcy ya que incrementa la remetilación de la Hcy y su transulfuración subsiguiente (56,59,60).

Debido a un mecanismo excretor celular de Hcy, el plasma contiene sólo concentraciones pequeñas de Hcy (promedio 10 $\mu\text{mol/L}$). El mecanismo excretor complementa el catabolismo de la Hcy mediante la transulfuración manteniendo baja la concentración intracelular de Hcy citotóxica. En la HHC, la Hcy está elevada y, si exceptuamos la insuficiencia renal, su presencia indica que su metabolismo está alterado. El mecanismo excretor coloca a la Hcy en la sangre, de tal forma que limita la toxicidad intracelular pero aumenta la posibilidad de daño vascular por el efecto deletéreo de la HHC (61).

La Hcy se mide en plasma o suero por diferentes métodos, incluyendo polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, cromatografía de gas con espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y análisis de aminoácidos. La Hcy se mide tanto en ayuno como después de una carga oral de metionina (COM). Éste método es sensible para determinar alteraciones de la transulfuración, por deficiencia de vitamina B6 o deficiencia parcial de CBS. La Hcy post-COM se mide luego de administrar una dosis estándar de metionina (100 mg/Kg de peso corporal) para luego obtener sangre en intervalos diversos (de 2 a 8 horas). Si el metabolismo de la Hcy está intacto la tHcy aumentará (un promedio de 20 $\mu\text{mol/L}$), y regresará a los valores basales o de ayuno en un lapso de varias horas. Una COM es anormal cuando la Hcy plasmática es $>2\text{DE}$ arriba del valor basal (62-64).

Aunque la prueba post-COM tiene la desventaja de que no se conocen claramente sus límites de referencia estándar, ayuda a discriminar alteraciones de la transulfuración o remetilación; identifica pacientes con un metabolismo de Hcy alterado a pesar de tener una determinación basal en ayuno normal y que, por lo tanto, tienen un riesgo mayor para enfermedad vascular (64-66). La prueba post-COM puede identificar >50% de los sujetos con HHC por lo que es el método más sensible para detectar HHC moderada (67).

La concentración plasmática o sérica de Hcy se expresa en $\mu\text{mol/L}$ y varía con la raza, edad y sexo. El promedio de Hcy basal para hombres y mujeres adultos sanos es 10 y 11 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente. Sin embargo, el intervalo “normal” en la población sana va de 5 a 12 $\mu\text{mol/L}$. No hay consenso en la definición de HHC y existen diferencias sustanciales en los valores de referencia. El límite superior (percentil 95) de la población sana va de 15 a 16 $\mu\text{mol/L}$; sin embargo, la distribución de la concentración de Hcy sigue una distribución normal por lo que la definición de HHC en base a percentiles no es apropiada (64). Así, la HHC usualmente se define usando 2DE arriba del valor promedio de la población normal. La HHC se define en las categorías leve (16 a 30 $\mu\text{mol/L}$); moderada (31 a 100 $\mu\text{mol/L}$) y grave (>100 $\mu\text{mol/L}$) (68,69). Su prevalencia depende del criterio utilizado; por ejemplo, con los criterios arriba mencionados es posible que hasta 5% de la población normal presente HHC (70,71).

Causas de HHC.

La HHC es el resultado metabólico de la interacción entre factores genéticos, dietarios y hormonales (Tabla 3):

Tabla 3. Causas de hiperhomocisteinemia.

Padecimientos asociadas
1. Deficiencias y mutaciones enzimáticas Cistationina B-sintasa (CBS) Metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) Metionina sintasa
2. Mutaciones en la vía de la vitamina B12 (cobalamina)
3. Deficiencias nutricionales: Ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6
4. - Enfermedades crónicas: Insuficiencia renal crónica Lupus eritematoso sistémico Hipotiroidismo Diabetes Mellitus Enfermedad Intestinal Inflamatoria Neoplasias Psoriasis
5. Medicamentos: Anticonvulsivantes (hindantoína, carbamazepina) Hipolipemiantes (colestiramina, colestipol, ácido nicotínico). Metotrexate. Teofilina Ciclosporina
6. Dieta hiperproteica (aumento en consumo de metionina)
7. - Reactante de fase aguda

La asociación entre deficiencia nutricional e HHC es particularmente importante por la prevalencia de la primera en nuestra población y porque explica una buena parte de casos con HHC leve (hasta 60% de los casos). Además, permite establecer un tratamiento preventivo para la enfermedad vascular a bajo costo. Existe una asociación no lineal e inversa entre la concentración de Hcy con la de folato plasmático así como con la ingesta de esta vitamina. Existe una asociación inversa más débil con la concentración de vitamina B12 y fosfato de piridoxal plasmáticos y con la ingesta de vitamina B6 pero no con la B12

(72). La Hcy en ayuno está elevada en >95% de los deficientes de ácido fólico y vitamina B12 (73-75). La deficiencia de vitamina B6 se asocia primariamente con HHC post-COM. Los niveles plasmáticos bajos de folato y vitamina B12 se presentan en 60% de los pacientes con HHC. La mayoría de las HHC son atribuibles a niveles séricos bajos de folatos ya que esta deficiencia es más frecuente que la de vitamina B12 (76).

Mecanismos de daño vascular en la HHC.

El mecanismo probable de lesión vascular por la HHC es todo un tema de investigación. El endotelio ha recibido considerable atención como punto final de la lesión provocada por la HHC. Se sugiere que la trombogenicidad de la HHC reside en la modificación de la resistencia endotelial a la trombosis por varios mecanismos a los que siguen la activación plaquetaria y la formación de trombos. Entre estos mecanismos están la inducción de estrés oxidativo (que aumenta la expresión de factor tisular endotelial), el aumento en la producción de tromboxano por las plaquetas y la promoción del efecto antifibrinolítico de la Lp(a) (76).

Se sugiere que el daño endotelial se asocia a deterioro de la matriz extracelular por activación directa de la metaloproteínasa-2 por el grupo tiol de la Hcy (72). Otro mecanismo es que la Hcy acelera la aterosclerosis al incrementar los niveles de S-adenosilHcy, un inhibidor potente de la metiltransferasa en el endotelio lo cual inhibe la síntesis de DNA en las células del endotelio lo que detiene su crecimiento en la fase G1 del ciclo celular. Esto es, porque la Hcy disminuye la carboximetilación de p21-ras, un regulador de la fase G1, cuya actividad es

regulada por metilación (56). Así, pareciera que el daño endotelial es secundario a las características químicas

del grupo tiol (R-SH) de la Hcy, el cual se oxida para formar disulfuros (RSSR), en este proceso, el grupo tiol reacciona con el ión superóxido (O_2^-) en presencia de iones cobre, lo que produce peróxido de hidrógeno (“especies de oxígeno reactivas”), el cual promueve la peroxidación de lípidos, además, el grupo tiol reacciona con su propio grupo carbonilo en el carboxilo terminal para formar Hcy-tiolactona, la forma ciclizada altamente reactiva de la Hcy. La tiolactona homocisteiniliza diversas proteínas en condiciones fisiológicas; una de estas proteínas es la apoproteína B de las LDL, la cual tiene un papel fundamental en la aterogénesis ya que forma agregados que son captados por los macrófagos en la íntima arterial para formar células espumosas, placas fibrolipídicas, trombos y el desarrollo global de placas ateroscleróticas (56,77,78). El daño producido por HHC involucra diversos factores del sistema de coagulación y se apoya en la teoría clásica de la aterotrombosis: el problema iniciaría con la formación de radicales libres de oxígeno que producen daño vascular oxidativo, proliferación de músculo liso, alteración estructural y funcional endotelial y aumento de la trombogenicidad que finalmente conduce a aterotrombosis (Tabla 4).

Tabla 4. Patogénesis del daño vascular inducido por Hcy.

1. Disfunción endotelial

Producción disminuida de óxido nítrico (ON)
Aumento en la producción de especies de oxígeno reactivas
Aumento del factor von Willebrand y trombomodulina
Aumento en la producción de factor tisular
Disminución en la producción de antitrombina (AT)
Engrosamiento de la íntima

2. Estrés oxidativo

Producción aumentada de EOR
Disminución de la actividad antioxidante del plasma.
Aumento en la peroxidación de los lípidos

3. Células del músculo liso vascular

Aumento en la proliferación
Aumento en la formación de células espumosas

4. Lipoproteínas de baja densidad

Tiolación
Aumento en la peroxidación de los lípidos
Aumento en la captación de LDL por los macrófagos

5. Vías hemostáticas

Aumento en la producción de tromboxano A₂ por las plaquetas
Aumento en la actividad de los factores V y X
Aumento en el fibrinógeno plasmático
Inhibición de la activación de la PC

Hiperhomocisteinemia en pacientes con SIDA.

Aunque la información a este respecto es escasa e incompleta, cabe mencionar que se ha intentado evaluar si el HAART induce algún daño metabólico asociado a un aumento en el riesgo para desarrollar daño vascular. En el estudio de Weiss *et al*, se midió la concentración de Hcy plasmática en 38 pacientes infectados por el HIV con una edad promedio de 39 años y sin antecedentes de enfermedad cardiovascular. La medición se

realizó antes y después de 250 días de haber iniciado el HAART. La terapia ARV consistió de ANTRs solos o en combinación con ANNTRs y/o IPs. Se observó un incremento significativo en la Hcy plasmática de 11.7 +/- 0.8 a 15.1 +/- 1.0 $\mu\text{mol/L}$ en los pacientes con HAART. El incremento en la Hcy se observó en los pacientes que tomaban nelfinavir y/o ANNRTs más ANTRs, pero no con ANRTs solos (79).

En el estudio de Larrañaga *et al*, se estudiaron 53 pacientes HIV+ sin tratamiento alguno, 75 pacientes HIV+ bajo tratamiento ARV y 31 controles sanos; se correlacionaron los niveles de Hcy plasmática con los niveles de folato, vitamina B12, lípidos, estatus de insulino-resistencia, marcadores de activación plaquetaria (P-selectina soluble) y daño endotelial (trombomodulina soluble) así como su relación con tabaquismo, estadio de la enfermedad y tipo de tratamiento. No encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de vitamina B12, Hcy, P-selectina y estatus de insulino-resistencia entre los controles y los HIV+. El 16.4% de los 128 pacientes HIV+ presentaron una Hcy ≥ 15 $\mu\text{mol/L}$, sin embargo, al compararlo con el grupo control no encontraron diferencias significativas. Los niveles de Hcy presentaron una correlación negativa leve con los niveles de ácido fólico. No encontraron diferencias significativas entre el grupo de fumadores y no fumadores o entre el grupo HIV+ bajo tratamiento ARV vs el grupo HIV+ sin tratamiento o con el uso de ciertos ARV (80).

JUSTIFICACIÓN.

En años recientes, el uso de mejores medicamentos para el tratamiento de la infección por el VIH, en especial en la fase de SIDA, ha permitido una sobrevida mucho mayor a la esperada en los primeros años luego de la descripción de la infección. Esto, en gran medida, se debe a la disposición de medicamentos altamente específicos y efectivos que se crearon en los últimos años y que permitieron desarrollar el HAART. Sin embargo, el aumento en la sobrevida propició la aparición de complicaciones que jamás se observaron al inicio de la infección. Una de estas complicaciones es la enfermedad tromboembólica venosa, prácticamente desconocida en asociación al SIDA en los años iniciales de la epidemia y que hoy se reconoce como una complicación relativamente frecuente. Reportes recientes sugieren que pacientes infectados con el VIH pueden tener un incremento en el riesgo de trombosis pero la etiología, los factores de riesgo y el curso clínico permanecen indefinidos (81). Los mecanismos por los cuales estas dos situaciones se asocian, trombosis y SIDA, permanecen sin esclarecer. En la CLISIDA del Hospital General Regional Gabriel Mancera describimos una de las series de enfermedad tromboembólica venosa más grandes del mundo, es decir, 34 eventos trombóticos en pacientes con SIDA en un periodo de 40 meses (28). Ya que el problema está presente en nuestra población, se hace necesaria una revisión de las probables etiologías que expliquen este fenómeno. Debido a que la HHC es un factor de riesgo independiente para desarrollar enfermedad tromboembólica, tanto arterial como venosa, el objetivo del presente proyecto es conocer si el uso de HAART induce HHC en pacientes mexicanos con SIDA, una asociación que ayudaría a explicar alguna parte de la etiología de las complicaciones en esta población específica.

PREGUNTAS DE INVESTIGACION.

1. ¿El uso de la Terapia Antirretroviral Altamente Efectiva (HAART) en pacientes con SIDA induce la aparición de Hiperhomocistinemia (HHC)?
2. ¿La aparición de Hiperhomocistinemia es secundaria a la disminución de la concentración plasmática de ácido fólico, vitamina B6 o vitamina B12?

HIPOTESIS.

1. El uso de la Terapia Antirretroviral Altamente Efectiva en pacientes con SIDA induce la aparición de Hiperhomocistinemia.
2. La presencia de Hiperhomocistinemia en pacientes con SIDA no se debe a la disminución de la concentración plasmática de ácido fólico, vitamina B6 y vitamina B12 secundaria al tratamiento con HAART.

OBJETIVOS.

Objetivos generales

Determinar si la Terapia Antirretroviral Altamente Efectiva en pacientes con SIDA induce Hiperhomocistinemia.

Establecer si existe correlación entre Hiperhomocistinemia y disminución de la concentración plasmática de ácido fólico, vitamina B6 o vitamina B12 en el paciente con SIDA que inicia HAART.

Objetivos específicos

Determinar los valores de Homocisteína total (tHcy) en ayuno, antes y después de 6 meses de tratamiento antirretroviral en pacientes con SIDA mediante HPLC.

Evaluar el metabolismo de la Homocisteína en base a una carga oral de metionina (COM) antes y después de 6 meses de tratamiento antirretroviral en pacientes con SIDA.

Determinar el porcentaje de Hiperhomocistinemia tanto en ayuno como después de una COM antes y después de 6 meses de tratamiento antirretroviral.

Determinar los valores de vitamina B6, B12 y ácido fólico antes y después de 6 meses de tratamiento antirretroviral en pacientes con SIDA.

Determinar la frecuencia de Hiperhomocistinemia en cada esquema de tratamiento antirretroviral.

Evaluar el apego al tratamiento antirretroviral mediante la cuenta de células CD4 y carga viral en pacientes con SIDA.

PACIENTES Y MÉTODOS.

A. Universo de trabajo.

Pacientes con SIDA de la CLISIDA del HGR Gabriel Mancera que inician HAART.

B. Tipo de estudio.

Observacional, prospectivo, descriptivo, con un diseño antes-después.

C. Criterios de inclusión, no inclusión y exclusión.

C1. Inclusión.

* Pacientes adultos con SIDA. SIDA se definirá como la presencia de anticuerpos en el plasma de un paciente corroborados por una prueba positiva de ELISA y confirmada mediante Western Blot en pacientes que cumplen con los criterios A3, B3, C1, C2 y C3 de la OMS.

*Pacientes adultos con infección por VIH sintomática o asintomática en quienes esté indicado el inicio de tratamiento antirretroviral, como lo indicado en la tabla 1 de la introducción.

*Mayores de 16 años.

* Ambos sexos.

* Que requirieran y aceptaran iniciar tratamiento ARV.

C2. No inclusión.

* Insuficiencia renal aguda o crónica

* Insuficiencia hepática.

* Incapacidad para tolerar la COM.

* Expectativa de vida <3 meses.

* Neoplasia asociada al SIDA.

* Infección oportunista grave.

- * Embarazo.
- * No aceptación del paciente para ingresar al estudio
- * Emaciación generalizada.
- * Enfermedades crónicas que provocan HHC como las descritas previamente en la introducción

C3. Exclusión.

- * Pacientes con SIDA con terapia ARV que no alcanzaron HAART durante el estudio.
- * Pacientes que no desearon continuar con el estudio.
- * Pacientes que fallecieron antes de terminar el estudio.

D. Tamaño de la muestra.

Ya que en la literatura médica no existía información suficiente acerca de la prevalencia de HHC en pacientes con SIDA que recibían HAART, no pudo ser calculado el tamaño de muestra, por lo que se incluyeron 70 pacientes con SIDA consecutivos que iniciaron HAART durante un periodo de 2 años. Posteriormente se realizó el cálculo de tamaño de muestra en base al estudio de Weiss et al (79), uno de los primeros trabajos que reportó la frecuencia de HHC en pacientes con SIDA bajo tratamiento ARV, incluyó 38 pacientes y encontró un incremento significativo de las concentraciones de Hcy de 11.7 a 15.1 $\mu\text{mol/L}$ antes y después de 250 días de HAART, sin embargo, al calcular el tamaño de muestra con estos datos y con la fórmula para comparar medias de variables continuas con un α de 0.025, una β de 0.20 y un tamaño estandarizado del efecto de 1.0, hubiesen sido necesarios 16 pacientes. Sin embargo, se decidió incluir 70 pacientes con SIDA que iniciaron HAART como lo planeado al inicio del estudio.

E. Descripción de variables.

E1. Independientes.

E1.1. HAART.

E2. Dependientes.

E2.1. HHC.

E2.2. Concentración sérica de folato, vitamina B12 y vitamina B6.

E3. De confusión.

E3.1. Ingesta de fármacos que afectan la función renal o hepática como los descritos en la introducción.

E3.2. Deficiencias nutricionales.

E3.4. Dieta hiperproteica.

F. Definición de las variables.

Variable	Definición operacional	Tipo	Escala de medición
HAART	Inicio de un tratamiento ARV altamente efectivo que comprende el uso de 3 medicamentos y que disminuye efectivamente la carga viral del enfermo generalmente en un plazo de 2 meses y que eleva la cantidad de CD4s en >50 células en el mismo plazo.	Nominal dicotómica	Presente/ausente
HHC	Aumento en la concentración plasmática de Hcy igual o mayor a 12.0 $\mu\text{mol/L}$. Tipo 1: aumento de la concentración de Hcy plasmática en ayuno (basal). Tipo 2: aumento en la concentración de Hcy plasmática post-COM.	Nominal dicotómica Cuantitativa continua Cualitativa nominal	Presente/ausente $\mu\text{mol/L}$ Tipo 1 Tipo 2

Concentración plasmática de folato y vitaminas B12 y B6	Cuantificación de la concentración plasmática de cada uno de estas tres vitaminas mediante inmunoensayo.	Cuantitativa continua	μmol/L
---	--	-----------------------	--------

G. Grupos de estudio.

Un solo grupo de estudio.

H. Procedimiento.

Una vez reunidos los criterios para ingresar al estudio, informados y con carta de aceptación firmada, a los pacientes con SIDA que iniciaban HAART se les tomaron 3 mL de sangre en un tubo con EDTA en ayuno y luego de 8 horas post-COM. Esta misma muestra se volvió a tomar seis meses luego del inicio de HAART. Para la COM, se administraron 100mg de metionina/kg de peso diluidos en 200 mL de jugo de naranja a las 12:00 am y la muestra se tomó a las 8:00 am del día siguiente. Las muestras sanguíneas se pusieron en hielo y se centrifugaron a 5000 x g por 5 minutos, para obtener el plasma pobre en plaquetas. El sobrenadante se almacenó en dos aliquotas a -80 °C hasta su procesamiento. Una de ellas se utilizó para medir la vitamina B12, B6 y ácido fólico y se llevó a cabo mediante el equipo comercial Beckman Access Immunoassay System. La cuantificación de la Hcy plasmática se realizó utilizando HPLC de acuerdo a la técnica previamente descrita por Refsum (82) y Carducci (83) que evalúa la concentración de tHcy. Se llevó a cabo el seguimiento de todos los pacientes que iniciaron tratamiento ARV el cual consistió en cuantificar la carga viral y el número de células CD4, lo anterior permitió valorar el desarrollo de HAART y en base a ello determinar su apego al tratamiento.

Determinación homocisteína

El plasma fue separado de las células sanguíneas inmediatamente después de haberse obtenido la muestra, mediante centrifugación, y fue almacenado a -80° hasta la determinación. Los niveles de Hcy total plasmática se determinaron con HPLC con detección de fluorescencia de acuerdo a la siguiente técnica:

1. Descongelar las muestras y tomar 100 μ L.
2. Adicionar 20 μ L del estándar interno (ácido homocisteico) y 20 μ L del agente reductor ditioetriol (DTE).
3. Agitar y esperar 10 minutos.
4. Precipitar las proteínas adicionando 300 μ L de ácido iodoacético 50 mM diluido en perclórico al 6%. La Hcy es carboximetilada con el iodoacetato antes de la derivatización con oftaldialdehído (OPA).
5. Centrifugar por 10 minutos a 15,000 RPM.
6. Filtrar el sobrenadante.
7. Colocar 100 μ L en un vial y añadir 30 μ L de NaOH 3N y agitar.
8. Añadir 20 μ L de OPA y agitar.
9. Mantener la temperatura de cada vial a 4°C hasta su procesamiento.
10. Inyectar un volumen de 10 μ l.
11. Obtener el cromatograma para su análisis.

La determinación se llevó a cabo en un módulo de separación 2690 con un detector de fluorescencia (excitación de 338 nm, emisión de 425 nm), de Waters technologies Corp. La

separación se efectuó en una columna analítica Kingsorb C18, 150 x 4.6 mm, 3 μ m (Phenomenex).

Se prepararon dos disolventes, A: 0.02M de fosfato de sodio, amortiguar a pH 7, tetrahidrofurano 96:4 (100 mL NaPO₄⁻, 80 mL de tetrahidrofurano y 820 mL de agua destilada). B: 0.02M de fosfato de sodio, amortiguar a pH 7, acetonitrilo 45:55 (100 mL de PO₄⁻, 400 mL de agua destilada y 1500 mL de acetonitrilo). La determinación de la Hcy se obtuvo mediante un gradiente lineal de disolventes, sus concentraciones fueron las siguientes:

Minuto	A	B
0	78%	22%
7	70%	30%
13	0	100%

Para la separación de los componentes de la muestra se programó un flujo de 1.3 mL/min a una presión menor a 3500 psi. La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C.

Determinación de vitamina B12 y ácido fólico

Procedimiento para medir ácido fólico en suero o plasma:

1. La muestra de suero debe recibir tratamiento para liberar el folato de las proteínas endógenas de fijación.
2. Después de neutralizar la mezcla, se añaden al tubo de reacción la proteína de unión a folato, proteína anti-folato de ratón, conjugado de ácido fólico-fosfatasa alcalina y anticuerpo de cabra anti-ratón unidos a partículas paramagnéticas. El folato en la

muestra compete con el conjugado de ácido fólico-fosfatasa alcalina por los lugares de fijación sobre una cantidad limitada de proteína de fijación de folato.

3. Los complejos resultantes se fijan a la fase sólida a través de la proteína de fijación anti-folato de ratón.
4. La separación en un campo magnético y el lavado eliminan las moléculas no unidas a la fase sólida.
5. Se añade un sustrato quimioluminiscente, Lumi-Phos 530, al tubo de reacción y utilizando un luminómetro, se mide la luz generada por la reacción. La producción de luz es inversamente proporcional a la concentración de folato en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina por medio de una curva de calibración de puntos múltiples acumulada.

Procedimiento para medir vitamina B12 en suero o plasma:

1. Se añade una muestra de plasma o suero al tubo de reacción junto con cianuro potásico alcalino y DTE. Este tratamiento desnaturaliza las proteínas de unión a B12 y convierte todas las formas de vitamina B12 a la forma de cianocobalamina.
2. Después de la neutralización se añade a la muestra el factor conjugado con fosfatasa alcalina y partículas paramagnéticas revestidas con IgG anti-ratón: monoclonales de ratón anti-factor intrínseco. La vitamina B12 se une en la muestra al conjugado del factor intrínseco impidiendo que el conjugado se una a la fase sólida del anti-factor intrínseco.

3. La separación en un campo magnético y el lavado eliminan los materiales no fijados a la fase sólida.
4. Se añade un sustrato quimioluminiscente, Lumi-Phos 530, al tubo de reacción y utilizando un luminómetro, se mide la luz generada por la reacción. La producción de fotones es inversamente proporcional a la concentración de vitamina B12 en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina por medio de una curva de calibración de puntos múltiples acumulada.

I. Análisis estadístico.

Para la descripción de las características generales del grupo se utilizaron medidas de resumen así como de dispersión, media y desviación estándar, respectivamente. Para determinar si los valores de Hcy, vitamina B6, vitamina B12 o ácido fólico fueron estadísticamente diferentes antes del HAART y luego de 6 meses del mismo, se utilizó la prueba de T pareada o la prueba de Wilcoxon de acuerdo a la distribución muestral. Para conocer la distribución muestral de las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La frecuencia de HHC se expresó en porcentaje, para obtener la significancia estadística se utilizó la prueba de χ^2 . Se utilizó ANOVA de dos factores para medidas repetidas para analizar la asociación entre variables. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El trabajo de investigación fue aprobado por el Comité Local de Investigación del Hospital General Regional Gabriel Mancera del IMSS. Este estudio representó un riesgo mayor al mínimo debido a la toma de muestras sanguíneas así como por la administración de la COM, de la cual se han informado ciertos efectos leves como náusea, vómito o cefalea. Los pacientes fueron incluidos en el estudio sólo después de ser informados acerca de la naturaleza del estudio y dar su consentimiento por escrito para la utilización de sus muestras sanguíneas. Se tuvo cuidado y se aplicaron las normas de seguridad necesarias para los pacientes de acuerdo a los principios contenidos en el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki, la Enmienda de Tokio y el Informe Belmont.

En el anexo 2 y 3 se encuentran la Hoja de información para participar en el estudio así como la Carta de consentimiento informado que fueron utilizadas.

RESULTADOS

De 97 pacientes elegibles para este estudio, se incluyeron 70 pacientes con SIDA que alcanzaron el HAART y que completaron los 6 meses de seguimiento. La relación hombre: mujer fue de 6:1. Se observó que el inicio de la enfermedad se presenta 10 años antes en los pacientes de género masculino. En cuanto al estadio de la enfermedad, el mayor porcentaje de pacientes incluidos correspondió a las etapas B3 (40.6%) y C3 (18.8%). Las características generales de la población estudiada se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos demográficos y características generales de los pacientes del estudio.

	N	Porcentaje
Mujeres	10	14.2
Hombres	60	85.8
	Promedio	Max-Min
Edad Mujeres	48	26-73
Edad Hombres	37.2	20-63
Clasificación de los pacientes	Porcentaje	
A2	15.9 %	
A3	10.1 %	
B2	13.0 %	
B3	40.6 %	
C2	1.4 %	
C3	18.8 %	

A los seis meses de iniciado el tratamiento antirretroviral (ARV), los pacientes mostraron reducción de la carga viral y elevación en la cuenta de células CD4s de manera significativa, $p= 0.0001$ y $p= 0.001$, respectivamente. La tabla 6 muestra los cambios en la cuenta de células CD4 y carga viral a lo largo del período de estudio. El que los pacientes hayan mostrado esta

respuesta terapéutica indica que tuvieron apego al tratamiento ARV. La figura 2 muestra la efectividad del tratamiento ARV.

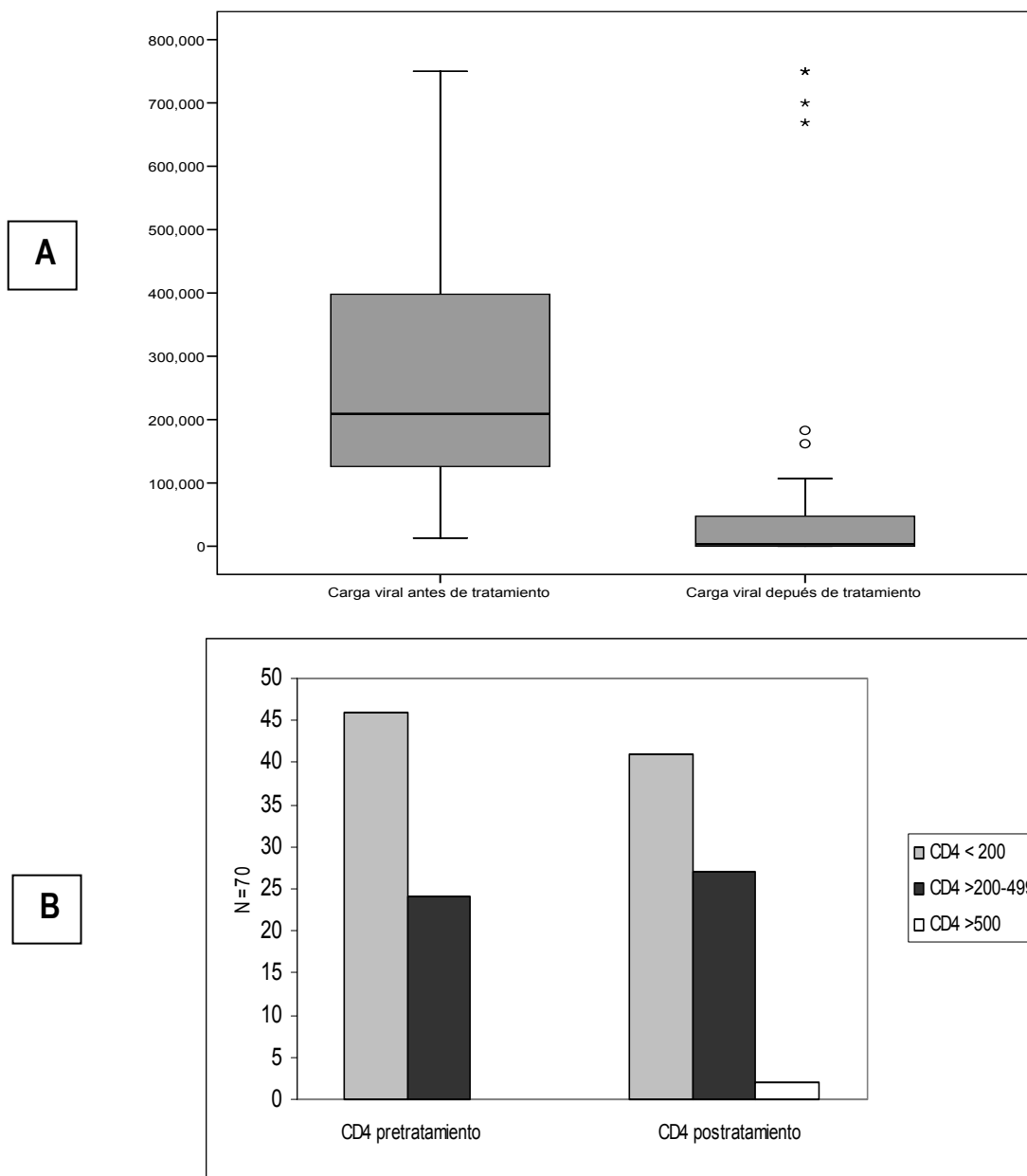


Figura 2. (A) Mediana, rango intercuartílico y casos extremos del número de copias virales antes y después del tratamiento ARV. Los valores se encuentran en copias/mL. (B) Cuenta de linfocitos CD4 antes y después del tratamiento ARV. Los valores se expresan en células/ μ L.

Tabla 6. Valores de células CD4 y carga viral antes y después del tratamiento ARV.

	Antes de tratamiento ARV		Después de tratamiento ARV		<i>P</i>
	Promedio	DE	Promedio	DE	
Cuenta de CD4s	139	(97.3)	222.28	(157.6)	0.0001*
Carga viral	325,529.7	(408,018.6)	82,898.4	(202,432)	0.001*

* Prueba de Wilcoxon.

Los valores de células CD4 se expresan en células/ μ L. Los valores de carga viral se expresan en copias/mL.

Observamos que las concentraciones de Hcy en ayuno antes de iniciar el tratamiento ARV se incrementaron de manera significativa después de 6 meses de seguimiento: 7.92 vs. 24.88 μ mol/L, respectivamente ($p < 0.001$). Así mismo, las concentraciones de Hcy post-COM incrementaron de 9.02 μ mol/L a 36.09 μ mol/L, antes y después de iniciar el tratamiento ARV respectivamente ($p < 0.0001$). Las concentraciones de Hcy se muestran en la tabla 7, figura 3.

Tabla 7. Efectos del tratamiento ARV sobre las concentraciones de Hcy antes y después de 6 meses de tratamiento ARV en pacientes con SIDA.

	Antes de tratamiento ARV		Después de tratamiento ARV		<i>P</i>
	Media	DE	Media	DE	
Hcy en ayuno	7.92	(3.40)	24.88	(14.63)	0.001*
Hcy post-COM	9.02	(2.96)	36.09	(16.17)	0.001*

* Prueba de Wilcoxon.

Los valores se expresan en $\mu\text{mol/L}$.

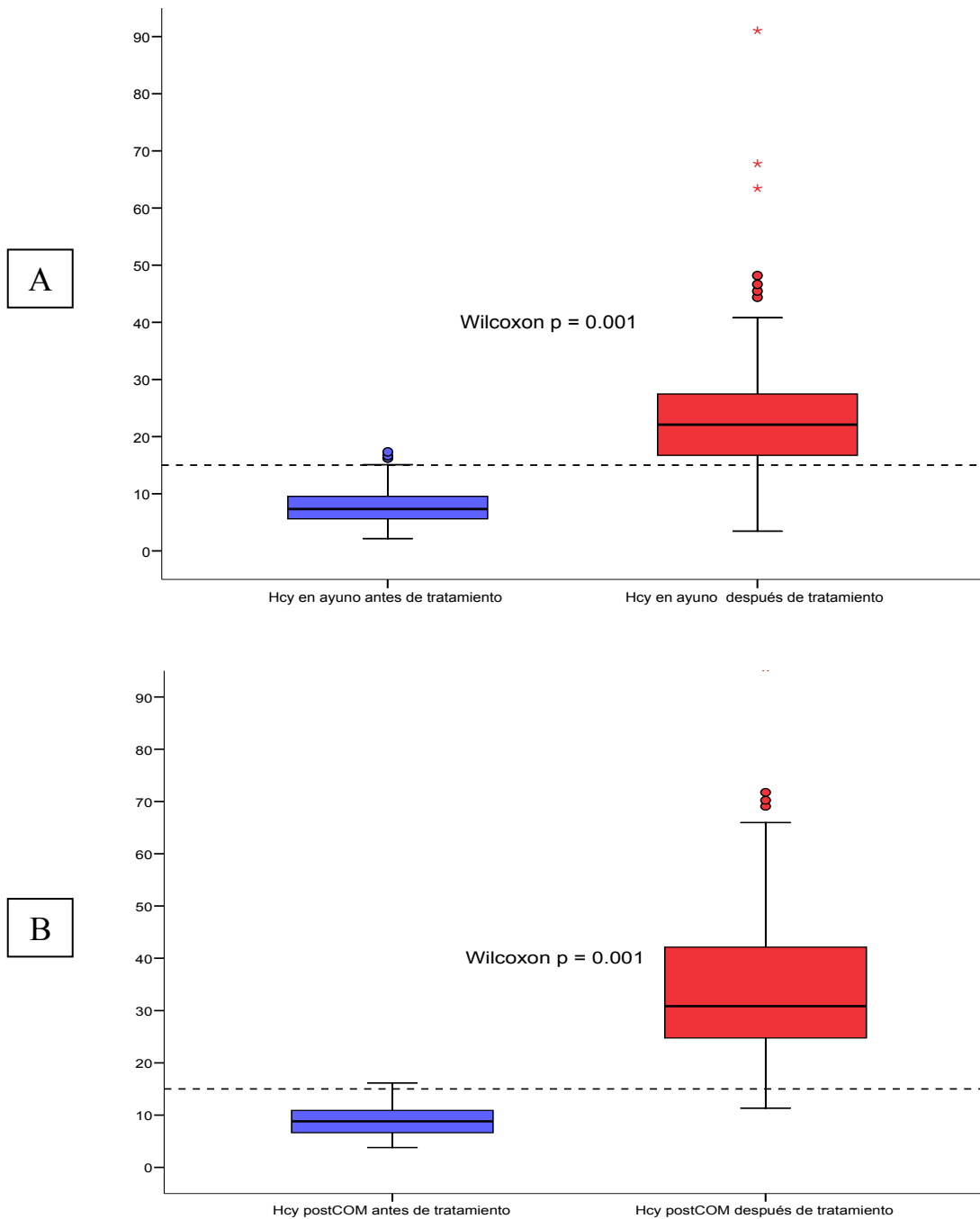


Figura 3. Medias, rangos intercuatílicos y casos extremos de las concentraciones de Hcy antes de iniciar el tratamiento ARV y luego de 6 meses de seguimiento en términos de las cuantificaciones en ayuno (A) y postCOM (B). Los valores se expresan en $\mu\text{mol/L}$.

La HHC en ayuno estuvo presente en 5.7% de los pacientes antes de iniciar la terapia ARV en comparación con 80% al final de los seis meses de seguimiento ($p < 0.0001$). La HHC post-COM se presentó en 4.2% de los pacientes antes de iniciar el tratamiento ARV, mostrando un incremento sustancial, ya que el 98.5% de los casos mostró este tipo de HHC al final de los 6 meses de seguimiento ($p < 0.0001$). Ver tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de HHC en ayuno y postCOM en pacientes con SIDA, antes y después de seis meses de tratamiento ARV.

	Antes de tratamiento ARV	Después de tratamiento ARV	<i>P</i>
	Porcentaje	Porcentaje	
HHC en ayuno	5.7	80	< 0.0001*
HHC post-COM	4.2	98.5	< 0.0001*

* Se utilizó χ^2

Al completar el estudio, se pudo observar que más de la mitad de los pacientes con SIDA bajo tratamiento ARV presentaban HHC en ayuno leve, menor a 30 $\mu\text{mol/L}$; sin embargo, posterior a la COM los valores de Hcy se incrementaron por arriba de 30 $\mu\text{mol/L}$ en el 50% de los casos, el 48.5% de los pacientes presentó valores menores a 30 $\mu\text{mol/L}$ y únicamente el 1.5% (un paciente) se mantuvo con cifras normales de Hcy. Los datos se muestran en la figura 4.

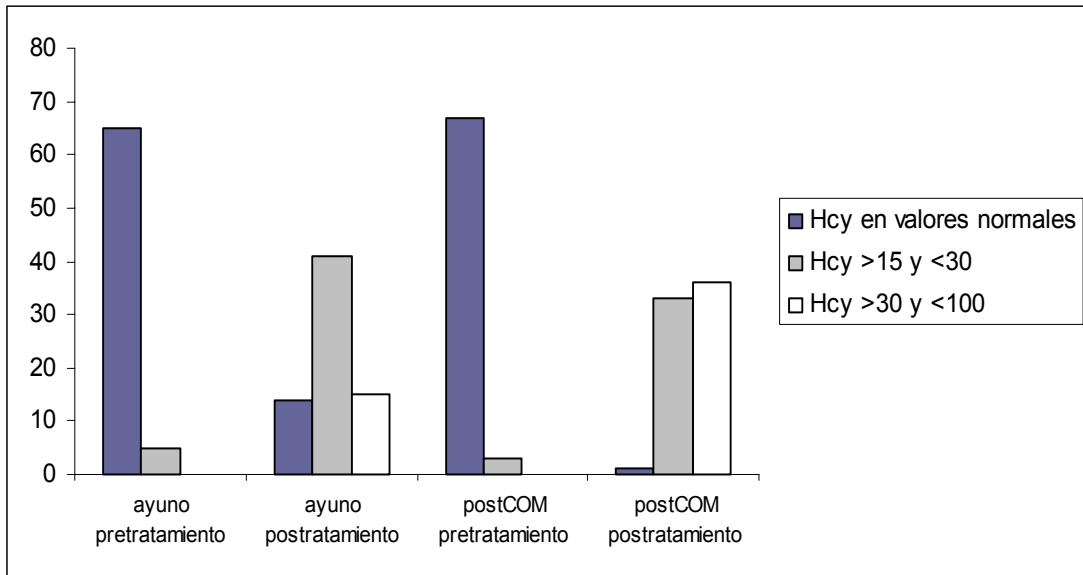


Figura 4. Tipo de HHC mostrada por los pacientes del estudio, antes y después de seis meses de tratamiento ARV; 15-30 $\mu\text{mol/L}$ leve, 30-100 $\mu\text{mol/L}$ moderada.

No encontramos diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de las vitaminas B6 y B12, antes y después de 6 meses de iniciado el tratamiento ARV. Las concentraciones de ácido fólico mostraron una diferencia significativa después de 6 meses de seguimiento, de 5.89 a 4.96 ($p=0.01$), sin embargo, únicamente 2 pacientes presentaron valores por debajo de 2.5 ng/mL después de haber alcanzado HAART, en comparación con un paciente antes del inicio del tratamiento ARV, figura 5. Ninguno de los pacientes tuvo deficiencia de las vitaminas B6 y B12 antes de iniciar el tratamiento ARV ni tampoco al final del periodo de estudio. Tabla 9.

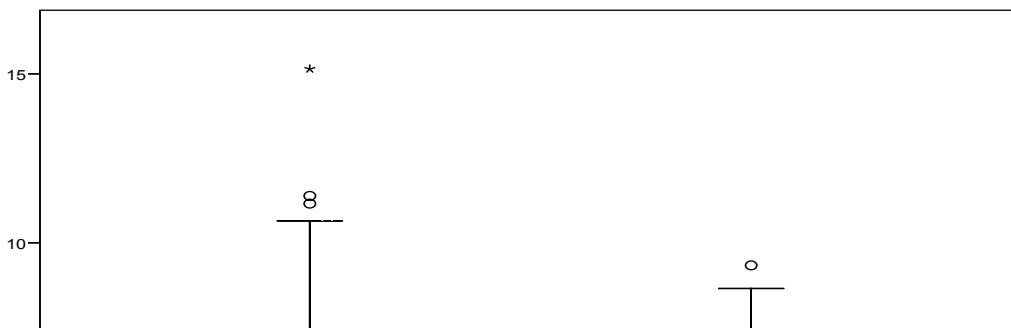


Figura 5. Medias, rangos intercuatílicos y casos extremos de las concentraciones de ácido fólico antes y después de iniciar el tratamiento ARV. Los valores se expresan en ng/mL.

Tabla 9. Efectos del tratamiento ARV sobre las concentraciones de ácido fólico, vitaminas B6 y B12 antes y después de 6 meses de tratamiento ARV en pacientes con SIDA.

	Antes del ARV	Tratamiento	Después del ARV	tratamiento	
	Media	DE	Media	DE	<i>P</i>
Vitamina B6	51.28	(24.08)	49.59	(19.04)	0.80
Vitamina B12	875.89	(491.38)	891.92	(471.71)	0.79*
Ácido fólico	5.89	(2.31)	4.96	(1.51)	0.01

* Se utilizó la prueba de T pareada. En el resto de las mediciones se utilizó la prueba de Wilcoxon. Los valores de vitamina B12 se expresan en pg/mL (valor normal de 180-914 pg/mL). Los valores de ácido fólico se expresan en ng/mL (valor normal >3.0 ng/mL).

La Figura 6 muestra los fármacos ARV empleados en los pacientes de este estudio. Como puede apreciarse, la gran mayoría recibía un IP y casi todos recibían un esquema triple de antirretrovirales. Debido al tiempo en que se realizó este estudio, una parte importante de los pacientes recibían la combinación zidovudina, didanosido y nelfinavir.

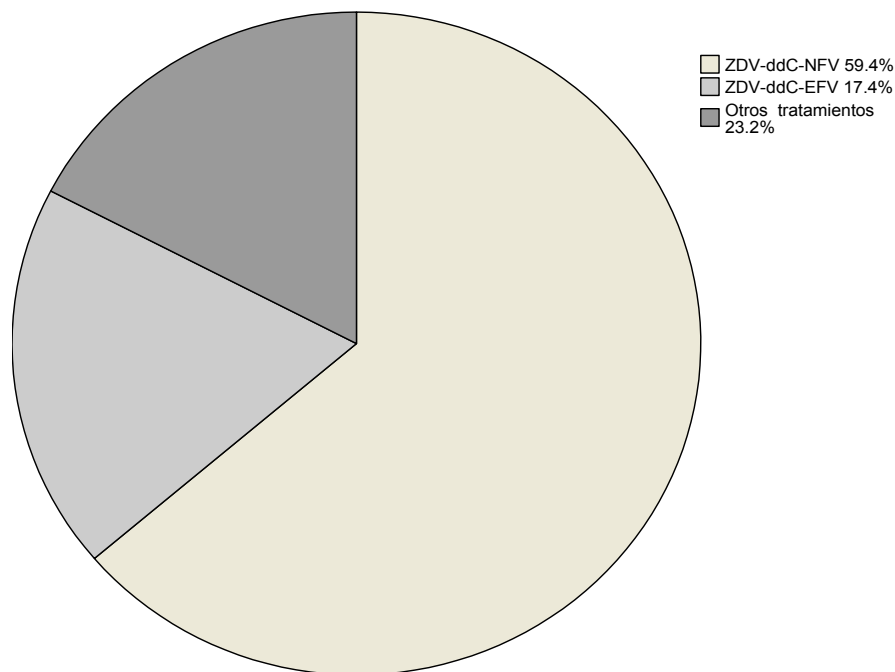


Figura 6. Fármacos y las combinaciones respectivas indicadas en los pacientes del estudio. En otros tratamientos se incluyen las combinaciones siguientes: d4T-ddC-NFV 1.4%, d4T-LMV-EFV 1.4%, ddI-ABC-EFV 1.4%, ddI-LMV-NFV 1.4%, ddI-LMV-SQV 1.4%, LZ-NVP 1.4%, ZDV-ddC-EFV 1.4%, ZDV-ddC-NVP 1.4%, ZDV-ddI-EFV 1.4%, ZDV-ddI-NFV 4.3%, ZDV-ddI-NVP 2.9%, ZDV-ddC-NFV 2.9%. Las siglas corresponden a: d4T: stavudina; ddC: zalcitabina; LMV: lamivudina; EFV: efavirenz; ddI: didanosina; SQV: saquinavir; LZ: lamivudina + zidovudina; NVP: nevirapina; ZDV: zidovudina.

Se comparó el efecto de los inhibidores de proteasa sobre las concentraciones de Hcy, observándose que tanto los pacientes que recibieron estos fármacos como los que no, muestran elevación de los niveles de Hcy ya sea en ayuno o postCOM antes y después de iniciar el tratamiento ARV, sin encontrarse diferencia significativa, $p= 0.82$ y $p=0.47$, respectivamente. Los datos se representan en la figura 7.

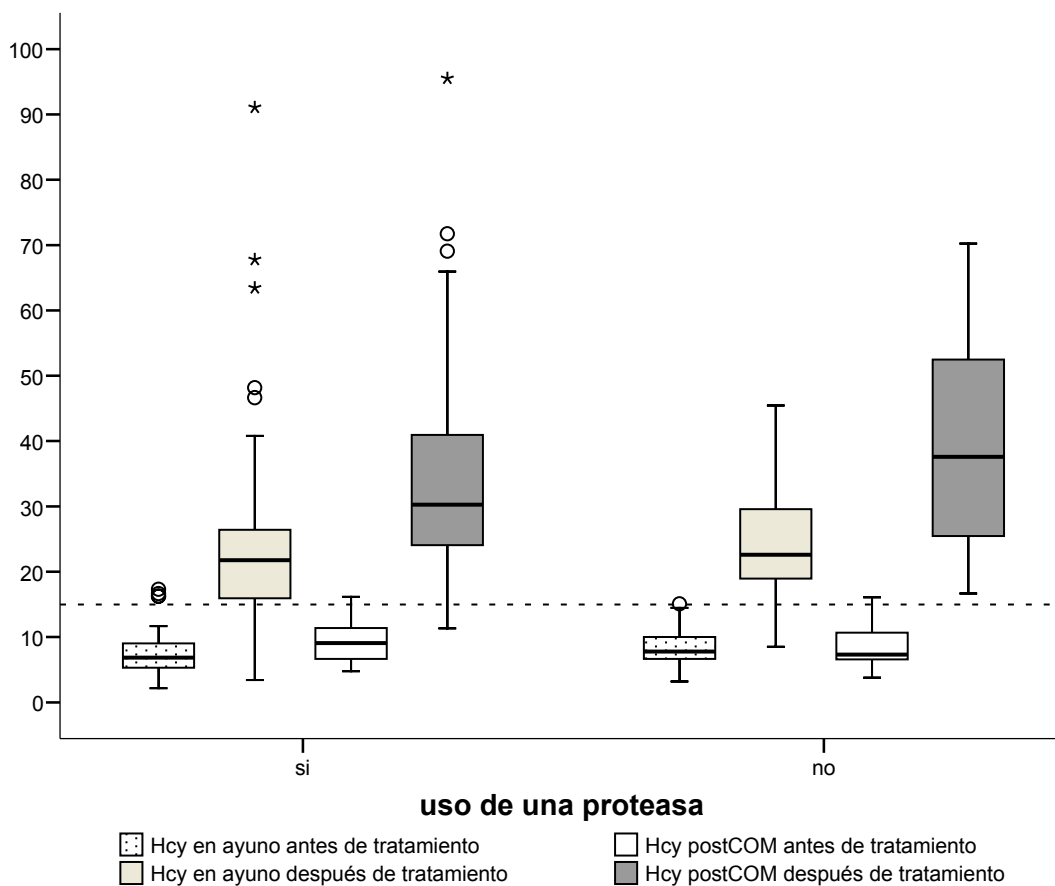


Figura 7. Efecto de los inhibidores de proteasa sobre la concentración de Hcy en ayuno y postCOM en pacientes con SIDA antes y después de tratamiento ARV.

DISCUSIÓN

Los avances en el tratamiento del SIDA han sido altamente exitosos luego de que se introdujeron en la terapia los inhibidores de proteasa (11). Tanto la evolución como el pronóstico de estos enfermos cambiaron positivamente en un periodo muy breve y, de hecho, la historia natural de la enfermedad fue modificada obteniéndose menores índices de mortalidad y complicaciones directamente relacionadas al SIDA (4). Sin embargo, es claro que estos tratamientos no son accesibles a grandes poblaciones en muchos países debido a los costos elevados de estas terapias y que el problema del apego terapéutico es un problema importante (16).

Sin embargo, muy poco tiempo después que los IPs hicieran su aparición, se comenzaron a observar algunos efectos adversos secundarios al tratamiento y complicaciones clínicas que nunca habían sido registradas para esta enfermedad. Sin duda, entre estas últimas, las complicaciones vasculares, en especial las trombóticas, inmediatamente llamaron la atención y se empezaron a informar en todo el mundo. Por ejemplo, en relación a la trombosis arterial, diversos análisis retrospectivos diseñados para estimar el riesgo de enfermedad aterotrombótica en relación a la terapia ARV muestran que el riesgo está elevado (84-86) Los hallazgos de estos estudios y otros más sugieren fuertemente que el riesgo de enfermedad cardiovascular puede ser mayor en los pacientes más jóvenes (87). Por otra parte, el estudio prospectivo más grande acerca del riesgo de enfermedad cardiovascular asociado con la terapia ARV (88), mostró que 0.5% de los pacientes que fueron incluidos en el estudio tuvieron un primer episodio de infarto agudo de miocardio con una incidencia de 3.5/1000 personas/año. Múltiples evidencias acerca del riesgo de infarto cerebral también han sido publicadas (89).

Está demostrado que la incidencia de infarto agudo de miocardio o de cualquier otra entidad isquémica se incrementa en proporción directa con el mayor tiempo de exposición a los medicamentos ARV (RR = 1.26; IC95% = 1.12-1.41, por años adicionales de exposición; $p < 0.001$). Aunque hasta ahora no existe información suficiente para evaluar cual clase específica o fármaco específico es el responsable de estos incrementos en los riesgos vasculares, es inobjetable que el riesgo de infarto agudo de miocardio en relación a la duración de la terapia ARV es significativo aunque se reduce relativamente al hacer el ajuste para las concentraciones plasmáticas de colesterol total, un hecho que sugiere que las anomalías metabólicas inducidas por la terapia ARV están influyendo directamente en este aumento en la morbilidad (88). Aunque el riesgo relativo para enfermedad isquémica aumenta en paralelo con la duración de la terapia ARV, el riesgo absoluto se mantiene bajo para la mayoría de los pacientes a excepción de aquéllos que tienen múltiples factores de riesgo vascular (90). De hecho, la mayoría de los factores de riesgo cardiovascular clásicos que afectan a las poblaciones sin la infección por el VIH se asocian con el riesgo de infarto agudo de miocardio, por ejemplo (88).

Por otra parte, la enfermedad tromboembólica venosa es una enfermedad clínica que va creciendo gradualmente en los pacientes con SIDA, un punto en el cual nuestro grupo publicó una de las series más grandes en el mundo. Aunque la HHC ha recibido gran atención en los últimos años como un factor de riesgo independiente para trombosis arterial y venosa (48,49), en una gran parte de los pacientes que han tenido una trombosis no se tiene un factor etiológico preciso (28). El estudio actual surgió como una necesidad de conocer más acerca de los mecanismos que inducen la trombosis en el paciente con SIDA.

Ya que la afección trombótica asociada al SIDA afecta tanto a los lechos arteriales como venosos, decidimos analizar las causas de trombofilia que pudieran explicar simultáneamente la aparición de trombosis en estos enfermos. El endotelio tiene un papel crucial en el mantenimiento de la sangre en estado líquido y por lo tanto en la génesis de la trombosis en los casos en los que su función está afectada. Esta disfunción endotelial está perfectamente demostrada en la infección por el VIH (43-45) y sabemos que la Hcy es tóxica en el espacio extracelular sitio en el que induce el daño endotelial (61). Sin embargo, los mecanismos que pudieran explicar la aparición tanto de la trombosis arterial como venosa no se han estudiado profundamente. Ya que la HHC es uno de los pocos factores de riesgo trombóticos tanto para trombosis arterial como venosa, y ante la falta de información en este campo en la literatura internacional, decidimos estudiar una causa para explicar estas asociaciones que pudiera ser la HHC misma. Si los eventos trombóticos aparecen en los enfermos con SIDA luego de que se instala la terapia ARV, conjeturamos que un estudio antes-después pudiera ayudarnos a establecer si existiera alguna relación con la aparición de HHC. Por lo tanto, diseñamos este estudio antes-después para determinar el impacto de la terapia ARV sobre las concentraciones de Hcy en pacientes con SIDA.

Existen diversas técnicas para cuantificar la concentración de Hcy. Algunos de estos métodos son fáciles y económicos pero carecen de la sensibilidad y especificidad que tienen los métodos considerados como estándar de oro. El problema con los métodos estándar de oro reside en la complejidad y costo de su realización. Para este estudio consideramos que era necesario aplicar la técnica de HPLC a pesar de todos sus inconvenientes inherentes en aras de ganar sensibilidad y especificidad en el estudio. Más aún, ya que no existen trabajos en la

literatura que hayan analizado el efecto de la terapia ARV sobre la concentración de Hcy luego de una COM, decidimos que en este trabajo debíamos hacer las cuantificaciones tanto en ayuno como luego de la ingesta de metionina con la intención de tener un panorama amplio y real de las alteraciones en el metabolismo de la Hcy asociadas a la terapia ARV. Este es un punto muy importante en este proyecto ya que está demostrado que con la medición post-COM se puede detectar una gran cantidad de pacientes con HHC que de otra manera hubieran pasado desapercibidos con la medición en ayuno, únicamente (67).

Los resultados de este estudio muestran que el inicio del tratamiento ARV se asocia con un incremento significativo en la concentración de Hcy ya sea cuando ésta se cuantifica en ayuno como, de manera más significativa, cuando se mide la concentración de este aminoácido no esencial luego de una COM. Encontramos que después de seis meses de tratamiento ARV el 80% de los pacientes presentan HHC en ayuno y hasta el 98.5% presenta HHC postCOM, dichos resultados fueron estadísticamente significativos. Los valores de Hcy en ayuno después de seis meses de seguimiento se encontraron entre 15-30 $\mu\text{mol/L}$ en la mayor parte de la población, observándose un incremento a más de 30 $\mu\text{mol/L}$ después de administrar la COM en el 50% de la población.

El metabolismo de la Hcy sigue dos rutas esenciales. Ya que las vitaminas B6 y B12 así como el ácido fólico tienen un papel fundamental en la generación de HHC cuando se encuentran por debajo de sus valores normales, en este estudio evitamos la influencia de estas variables de confusión midiendo dichas vitaminas antes de iniciar el tratamiento ARV y luego de 6 meses de seguimiento, para evaluar si la HHC se presentaba conjuntamente con alteraciones de las vitaminas B6 y B12 y del ácido fólico. Con esta estrategia evaluamos si los resultados del

estudio tenían influencia de las causas adquiridas más frecuentes de HHC en todo el mundo y que además no serían raras en una población infectada con el VIH y que frecuentemente tiene problemas de desnutrición antes del inicio del tratamiento de la enfermedad. Observamos en este estudio que las vitaminas B6 y B12 así como el ácido fólico no se encontraban alterados antes de iniciar el tratamiento ARV y tampoco disminuyeron sus niveles después de seis meses de seguimiento.

En un estudio, los autores investigaron el efecto del HAART sobre la concentración de Hcy y la cuantificaron en 38 pacientes con SIDA y sin historia de enfermedad trombotica arterial. La cuantificación se llevó a cabo antes de iniciar el tratamiento y luego de 250 días de tratamiento ARV encontrando que había un incremento en la concentración de Hcy de 11.7 ± 0.8 a 15.1 ± 1.0 $\mu\text{mol/L}$ aunque sólo en los pacientes que tomaban nelfinavir y/o ANNTRs + ANTRs pero no en aquéllos tomando sólo ANTRs (79). En este estudio no encontramos este tipo de asociación ya que todos los subgrupos de pacientes tomando diversos esquemas de tratamiento fueron afectados por la HHC.

En el estudio realizado por de Larrañaga et al (80) no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Hcy entre los pacientes bajo tratamiento ARV y los que aún no recibían este tratamiento, tampoco encontraron diferencia con los distintos tipos de antirretrovirales, concluyendo que los niveles de Hcy no están influenciados por la condición de VIH ni por los tratamientos antirretrovirales y sus efectos adversos. En nuestro estudio llegamos a conclusiones diferentes ya que los pacientes con SIDA bajo HAART presentan incremento en los niveles de Hcy en ayuno de 5.7 a 80% después de seis meses de tratamiento

antirretroviral y que hasta el 98.5% de la población estudiada presenta HHC postCOM después de iniciados los ARV.

Finalmente, en este estudio no fueron evaluados los hábitos dietéticos que tenía la población, evidentemente no presentaban alteración en los nutrientes que intervienen en el metabolismo de la Hcy, sin embargo, cabe la posibilidad de que consumieran alguna dieta hiperproteica con la consecuente elevación de la Hcy en ayuno. Este hecho es poco factible, ya que al administrar la COM se aprecia una inhibición a nivel de la vía de la transulfuración, lo cual no sería ocasionado por una dieta rica en proteínas, por lo que la causa principal de la HHC en este grupo de pacientes continúa apuntando hacia el tratamiento ARV.

CONCLUSIONES

En esta población se puede observar el impacto que posee la terapia ARV sobre las concentraciones de Hcy. Los pacientes bajo terapia ARV muestran alteraciones del metabolismo de la Hcy que no presentaban antes de iniciar el HAART, lo anterior fue observado después de seis meses de tratamiento ARV, ya que tanto en ayuno como posterior a una COM los pacientes mostraron un incremento significativo en las concentraciones de Hcy, lo que sugiere una alteración a nivel de la vía de la transulfuración.

Las vitaminas B6 y B12 así como el ácido fólico tienen un papel fundamental en la aparición de HHC cuando se encuentran por debajo de sus valores normales. Estos nutrientes se encontraron dentro de valores normales y no explican la aparición de HHC en pacientes con SIDA sometidos a tratamiento ARV.

Nuestros datos muestran que la HHC es un fenómeno que se hace evidente en los pacientes con SIDA que inician tratamiento ARV. Esta HHC es independiente de la desnutrición secundaria a la deficiencia de las vitaminas B6, B12 y ácido fólico.

La HHC aparece en los pacientes independientemente del fármaco o combinación de fármacos ARV utilizados en estos pacientes.

PERSPECTIVAS

Hasta el momento se desconocen los mecanismos que ocasionan las alteraciones en el metabolismo de la Hcy en los pacientes que han iniciado tratamiento ARV. Sin embargo, las observaciones de este estudio sugieren que podría existir alguna alteración a nivel de la vía de la transulfuración que debe investigarse.

Ya que este aspecto no había sido estudiado previamente, y en base a los hallazgos obtenidos, es necesario buscar las alteraciones causadas por el tratamiento ARV que hacen que los pacientes presenten un estado de hipercoagulabilidad que los predispone a eventos trombóticos que pudieran poner en peligro la vida.

Con este estudio se descartó que los inhibidores de proteasa estuvieran asociados con el incremento de la Hcy y que es el conjunto de antirretrovirales los que pudieran ocasionar la HHC; sin embargo, aún no se conoce el mecanismo causante de dicha alteración.

Ahora, debe establecerse cual es el riesgo real que imprime la presencia de HHC en los pacientes con SIDA luego de que inician tratamiento ARV con el objeto de conocer si es necesario intentar medidas específicas que disminuyan la concentración plasmática de este aminoácido y evitar así la posibilidad de eventos trombóticos arteriales o venosos, situaciones que aquejan frecuentemente a esta población.

BIBLIOGRAFIA.

1. ONUSIDA, AIDS Epidemic Update, December 2000.
2. Braumwald E, Fauci A, Hauser S, Jamenson L, Kasper D, Longo D. Harrison. Principios de Medicina Interna. 15° Ed, McGraw-Hill Interamericana, México 2000; 2034-2036.
3. Nieto L, Santoscoy MA, Treviño S, Casillas J. Tratamiento Antirretroviral en el Adulto con VIH/SIDA. Grupo Ixel Editores, México 2004; 9-23.
4. Mouton Y, Alfandari S, Valette M, Cartier F, Dellamonica P, Humbert G, Lang JM, Massip P, Mechali D, Leclercq P, Modai J, Portier H. Impact of protease inhibitors on AIDS-defining events and hospitalizations in 10 French AIDS reference centers. Federation National des Centres de Lutte contre le SIDA. AIDS 1997;11:F101-F105.
5. Threlkeld SC, Hirsch MS. Antiretroviral therapy. Med Clin North Am 1996; 80: 1263-1282.
6. Kamali F. Clinical pharmacology of 3'-dideoxynucleoside analogues. Clin Invest 1993; 71: 392-405.
7. Yarchoan R, Mitsuya H, Myers CE, Broder S. Clinical pharmacology of 3'-azido-2',3'-dideoxyThymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides. N Engl J Med 1989; 321:726-738.
8. Merluzzi VJ, Hargrave KD, Labadia M, Grozinger K, Skoog M, Wu JC, Shih CK, Eckner K, Hattox S, Adams J. Inhibition of HIV-1 replication by a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. Science 1990; 250:1411-1413.
9. Kaplan AH, Zack JA, Knigge M, Paul DA, Kempf DJ, Norbeck DW, Swanstrom R. Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. J Virol 1993; 67: 4050-4055.
10. Deeks S, Smith M, Holodniy M, Kahn J. HIV-1 protease inhibitors. JAMA 1997;227:145-153.
11. Gallant J. Strategies for long-term success in the treatment of HIV infection. Journal of the American Medical Association 2000; 283:1329-1334.
12. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, Henry WK, Lederman MM, Phair JP, Niu M, Hirsch MS, Merigan TC. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 counts from 200 to 500 per cubic millimeter. N Engl J Med 1996; 335: 1081-1090
13. CAESAR Coordinatory Committee. A controlled trial of addition of lamivudine or lamivudine plus loviride to zidovudine-containing regimens for patients with HIV-1 infection: the CAESAR trial. Lancet 1997; 349: 1413-1421.
14. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ Jr, Feinberg JE, Balfour HH Jr, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA. A Controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell count of 200 per cubic millimeter or less. N Engl J Med 1997; 337: 725-733.
15. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, Valentine FT, Jonas L, Meibohm A, Emini EA, Chodakewitz JA. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. N Engl J Med 1997; 337: 734-739.
16. Rutschmann O, Opravil M, Iten A, Malinverni R, Vernazza P, Bucher H, Bernasconi E, Sudre P, Leduc D, Yerly S, Perrin L, Hirschel B, and The Swiss HIV Cohort Study. AIDS 1998;12: F71-F77.
17. Rizzardì GP, De Boer RJ, Hoover S, Tambussi G, Chapuis A, Halkic N, Bart PA, Miller V, Staszewski S, Notermans DW, Perrin L, Fox CH, Lange GM, Lazzarin A, Pantaleo G. Predicting the duration of antiviral treatment needed to suppress plasma HIV-1 RNA. J Clin Invest 2000;105:777-782.
18. Yeni PG, Hammer SM, Carpenter Ch CJ, et al. Antiretroviral treatment for adult HIV Infection in 2002. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. JAMA 2002; 288:222-235.

19. Stone VE, Hogan JW, Schuman P, Rompalo AM, Howard AA, Korkontzelou C. Antiretroviral regimen complexity, self-reported adherence, and HIV patients' understanding of their regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;28:124-131.
20. Deeks SG. Determinants of virological response to antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2000;30(suppl 2):S177-S184.
21. Bangsberg DR, Hecht FM, Charlebois ED, Zolop AR, Holodniy M, Sheiner L. Adherence to protease inhibitors, HIV-1 viral load, and development of drug resistance in an indigent population. *AIDS* 2000;14:357-366.
22. Marchner IC. Use of changes in plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA to assess clinical benefit to antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1998;177:40-47.
23. Kim S, Hughes MD, Hammer SM. Both serum HIV type 1 RNA levels and CD4+ lymphocyte counts predict clinical outcome in HIV type 1-infected subjects with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:645-653.
24. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, Bremer JW, Elbeik T, Erice A, Kuritzkes DR, Scott WA, Spector SA, Basgoz N, Fischl MA, D'Aquila RT. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. *Ann Intern Med* 1997;126:929-938.
25. Rabinstein AA. Stroke in HIV-infected patients: A clinical perspective. *Cerebrovasc Dis* 2003; 15: 37-44.
26. Mooser, V. Atherosclerosis and HIV in the highly active antiretroviral therapy era: towards and epidemic of cardiovascular disease? *AIDS* 2003; 17 (suppl 1): 65-67.
27. Barbaro, G. HIV infection, antiretroviral therapy and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Risk* 2002; 9: 295-300.
28. Majluf-Cruz A, Silva-Estrada M, Sánchez-Barbosa R, Montiel-Manzano G, Treviño-Pérez S, Santoscoy-Gómez M, Ruiz de Chávez-Ochoa A, Corona-de la Pena N, Nieto-Cisneros L. Venous thrombosis among patients with AIDS. *Clin Appl Thromb Haemost* 2004;10:19-25.
29. Becker DM, Saunders TJ, Wispelwey B, Schain DC. Case report: venous thromboembolism in AIDS. *Am J Med Sci* 1992; 303: 395-397.
30. Stahl CP, Wideman CS, Spira TJ, Haff EC, Hixon J, Evatt BL. Protein S deficiency in men with long-term human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1993; 81: 1801-1807
31. Bissuel F, Berruyer M, Causse X, Dechavenne M, Trepo C. Acquired protein S deficiency: correlation with advanced disease in HIV-1 infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5 (5):484-489.
32. Jenkins R, Peters BS, Pinching AJ. Thromboembolic disease in AIDS is associated with cytomegalovirus disease. *AIDS* 1991; 5: 1540-1543.
33. Meyohas MC, Roullet E, Rouziou C, Aymard A, Pelosse B, Eliasceiwicz M, Frottier J. Cerebral venous thrombosis and dual primary infection with human immunodeficiency virus and cytomegalovirus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:1010-1011.
34. Vielhauer V, Schewe CK, Schlondorff D. Bilateral thrombosis of the internal jugular veins with spasmodic torticollis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and disseminated cytomegalovirus infection. *J Infect* 1998;37:90-93
35. Koller E, Gibert C, Green L, Mann M, Bernstein B. Thrombotic events associated with megestrol acetate in patients with AIDS cachexia. *Nutrition* 1999; 15: 294-298.
36. Force L, Barrufet P, Herreras Z, Bolibar I. Deep venous thrombosis and megestrol in patients with HIV infection. *AIDS* 1999; 13: 1425-1426
37. Duerksen DR, Ahmad A, Doweiko J, Bistrrian BR, Mascioli EA. Risk of symptomatic central venous thrombotic complications in AIDS patients receiving home parenteral nutrition. *J Parenter Enteral Nutr* 1996;20:302.

38. Toulon P, Lamine M, Ledjev I, Guez T, Holleman ME, Sereni D, Sicard D. Heparin cofactor II deficiency in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Thromb Haemost* 1993;15(70):730-735.
39. Koppel K, Bratt G, Schulman S, Bylund H, Sandström E. Hypofibrinolytic state in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitor-containing highly active antiretroviral therapy. *JAIDS* 2002;29(5):441-449.
40. Bloom EJ, Abrams DI, Rodgers GM. Lupus anticoagulant in the acquired immunodeficiency syndrome. *JAMA* 1986;256:491-493.
41. Cohen AJ, Philips TM, Kessler CM. Circulating coagulation inhibitors in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986;104:175-180.
42. Gold JE, Haubstock A, Zalusky R. Lupus anticoagulant and AIDS. *N Engl J Med* 1986;314:1252-1253.
43. Lafeuillade A, Alessi MC, Poizot-Martin I, Boyer-Neumann C, Zandotti C, Quilichini R, Aubert L, Tamalet C, Juhan-Vague I, Gastaut JA. Endothelial cell dysfunction in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5(2):127-131.
44. Janier M, Flageul B, Drouet L, Scrobahachi ML, Villete JM, Palangic A, Cottenot F. Cutaneous and plasma values of von Willebrand factor in AIDS: a marker of endothelial stimulation? *J Invest Dermatol* 1988;90(5):703-707.
45. Teitel JM, Shore A, Read SE, Schiavone A. Immune function of vascular endothelial cells is impaired in HIV. *J Infect Dis* 1989;160:551-552.
46. Pasternak RC, Grundy SM, Levy D. 27th Bethesda Conference. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:978-990.
47. Harjai KJ. Potential new cardiovascular risk factors: Left ventricular hypertrophy, homocysteine, lipoprotein(a), triglycerides, oxidative stress, and fibrinogen. *Ann Intern Med* 1999;131:376-386.
48. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337:230-236.
49. Taylor LM Jr, Moneta GL, Sexton GJ. Prospective blinded study of the relationship between plasma homocysteine and progression of symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 1999; 48:1047-1051.
50. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, as a risk factor for vascular disease: Plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473-477.
51. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine pathways and regulations. *Eur J Pediatr* 1998;157:S40-S44.
52. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997;90:1-11.
53. Moghadasian MH, McManus BM, Frohlich J. Homocysteine and coronary artery disease. *Arch Intern Med* 1997;157:2299-2308.
54. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr*. 1991;55:131-138.
55. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B12 vitamin and coronary artery disease. *Clin Med North Am* 2000 (1): 219-241.
56. Alemán G, Tovar A, Torres N. Metabolismo de la homocisteína y riesgo de enfermedades cardiovasculares: importancia del estado nutricional en ácido fólico, vitaminas B6 y B12. *Rev Inv Clin* 2001;53:141-151.
57. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985;31:624-628.
58. Garrow TA. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 1984;271:22831-22838.

59. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 1984;259:9508-9513.
60. Dudman NPB, Guo XW, Gordon RB. Human homocysteine catabolism. Three major pathways and their relevance to development of arterial occlusive disease. *J Nutr* 1996;126:1295S-1300S.
61. Van den Berg M, Boers GHJ. Homocystinuria: what about mild hyperhomocysteinemia?. *Postgrad Med J* 1996;72:513-518.
62. Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR. Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total homocysteine. *Atherosclerosis* 1995; 116:147-151.
63. Graham IM, Daly LE, Refsum HM. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1997;277:1775-1781.
64. De Vriese AS, De Sutter JH, De Buyzere M, Duprez D. Mild to moderate hyperhomocysteinemia in cardiovascular disease. *Acta Cardiol* 1998;53:337-334.
65. Guba SC, Fink LM, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia an emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. *Am J Clin Pathol* 1996;105:709-722.
66. Van der Griend R, Hass FJ, Duran M. Methionine loading test is necessary for detection of hyperhomocysteinemia. *J. Lab Clin Med* 1998;132:67-72.
67. Minniti G, Mannucci PM. Role of methionine load in detection of mild hyperhomocysteinemia. *J Inherit Metab Dis* 2003;26(Suppl 1):52-56
68. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992;12:279-298.
69. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998;44:1833-1843.
70. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998;338:1042-1051.
71. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: Pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996;87:3531-3544.
72. Bescond A., Augier T, Chareye C, Garcon D. Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:498-503.
73. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population *JAMA* 1993;270:2693-2698.
74. Brattstrom L, Israelsson B, Lindgard F, Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine B-synthase deficiency. *Metabolism* 1998;37:175-178.
75. Kang SS, Wong PWK, Norusis M. Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism* 1987;36:458-62.
76. Harpel P, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein (a) to fibrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;54:550-552.
77. McCully KS. Homocysteine, folate, vitamin B6 and cardiovascular disease. *JAMA* 1998;279:392-393.
78. Bland AD. Endothelial cell damage and homocysteine. *Atherosclerosis* 1994;94:89-91.
79. Weiis N, Koelle P, Postea O, Bogner J, Goebel F-D. Highly active antiretroviral therapy for HIV-infection increases plasma homocysteine concentrations. *J Inherit Metab Dis* 2003;26(Suppl 1):89.
80. de Larrañaga G, Alonso B, Puga L, Benetucci J. Homocisteina plasmática en infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Medicina (B Aires)*. 2003;63(5):393-8.
81. Jacobson MC, Dezube BJ, Aboulafia DM. Thrombotic complications in patients infected with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a case series. *Clin Infect Dis*. 2004;15;39(8):1214-1222.

82. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexo E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem*. 2004;50:3-32.
83. Carducci C, Birarelli M, Nola M, Antonozzi I. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine in plasma samples. *J Chromatogr A*. 1999;18;846(1-2):93-100.
84. Bozzette SA, Ake CF, Tam HK, Chang SW, Louis TA. Cardiovascular and cerebrovascular events in patients treated for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 2003;348:702-710.
85. Klein D, Hurley LB, Quesenberry CP Jr, Sidney S. Do protease inhibitors increase the risk for coronary heart disease in patients with HIV-1 infection? *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;30:471-477.
86. Mary-Krause M, Cotte L, Simon A, Partisani M, Costagliola D. Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men. *AIDS* 2003;17:2479-2486.
87. Currier JS, Taylor A, Boyd F. Coronary heart disease in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:506-512.
88. The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) Study Group. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;349:1993-2003.
89. d'Arminio Monforte A, Sabin CA, Phillips AN, Reiss P, Weber R, Kirk O. Cardio- and cerebrovascular events in HIV-infected persons. *AIDS* 2004;18:1811-1817.
90. Law MG, D'Arminio Monforte A, Friis-Moller N. Cardio- and cerebrovascular events and predicted rates of myocardial infarction in the DAD Study. In: *Proceedings of the 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, February 8-11, 2004*:737

ANEXOS.

ANEXO 1

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Número de paciente:

Nombre:

Edad:

Sexo:

Cédula:

Teléfono:

Categoría:

Fecha de ingreso y primera toma de muestra:

Tratamiento recibido:

Carga viral	Cuenta de CD4	Concentración de B6	Concentración de B12	Concentración de ácido fólico	Concentración de Hcy	Concentración de Hcy Post COM	Caja de almacenamiento

Carga viral y cuenta de CD4 subsecuentes:

Fecha							
Carga viral							
Cuenta de CD4							

Fecha de toma de segunda muestra:

Carga viral	Cuenta de CD4	Concentración de B6	Concentración de B12	Concentración de ácido fólico	Concentración de Hcy	Concentración de Hcy Post COM	Caja de almacenamiento

Comentarios: _____

México, D.F. a de del año 2004.

HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO.

EFECTO DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE EFECTIVA (HAART) SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HOMOCISTEINA EN PACIENTES CON SIDA

Investigadores:

Dra. Erika Coria Ramírez y Dr. Abraham Majluf Cruz.

Instituto Mexicano del Seguro Social.

La siguiente información describe el protocolo y su papel como participante.

Estimado Sr. (a): Me permito solicitarle unos momentos de su atención para informarle de las características del estudio que estoy realizando. La hiperhomocistinemia es una enfermedad grave que afecta a cualquier individuo, consiste en el aumento en la sangre de un compuesto de las proteínas llamado homocisteína. La homocisteína se ha asociado con el desarrollo de trombosis venosa y aterosclerosis, esto puede deberse a múltiples causas y aunque se conocen muchas de ellas, otras no están perfectamente establecidas. El objetivo de nuestro estudio es conocer la frecuencia de presentación de hiperhomocistinemia, en pacientes con SIDA que están bajo tratamiento antirretroviral, es decir, el porcentaje en que estos pacientes tienen en la sangre una concentración más alta de lo normal de la sustancia homocisteína. Con estos datos podremos determinar si es un problema importante en esta población, tanto que deba ser considerado un análisis de rutina en poblaciones grandes o bien si su trascendencia es mínima.

Si consiente en participar sucederá lo siguiente:

1. Se le tomará una muestra de sangre (3 mL) en ayuno.
2. Deberá ingerir una carga oral de metionina (COM). La cual consta de 100 mg/kg de peso de metionina disueltos en 200 mL de jugo de naranja. Esta se tomará a la media noche y se tomará una muestra de sangre a las 8:00 h del día siguiente.

3. Los 2 procedimientos anteriores se realizarán nuevamente después de seis meses del inicio de HAART.

Las molestias del estudio consisten exclusivamente en las punciones que se requieren para obtener la sangre y no tiene costo alguno. El único riesgo que existe es que después de ingerir la COM puede que se presente náusea o cefalea. También puede que presente dolor y amoratamiento en el sitio de extracción, los cuales desaparecerán en poco tiempo. Este estudio no le proporciona ningún beneficio adicional a conocer los resultados que se obtengan al final del estudio así como los obtenidos durante las consultas periódicas a las que usted asista, sin embargo, los resultados que se obtengan al final del estudio aportarán información nueva e importante sobre la frecuencia en la que se presenta el aumento de homocisteína en pacientes que reciban tratamiento antirretroviral. Esto permitirá que se desarrollen medidas para la prevención de la hiperhomocistinemia en todos los pacientes que estén bajo este tipo de tratamiento. Los datos obtenidos de su persona son absolutamente confidenciales, no serán utilizados con otro fin diferente al de esta investigación. Conserva el derecho a retirarse del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibe en la institución.

Gracias anticipadas por su comprensión de la trascendencia de este estudio. El investigador contestará cualquier pregunta sobre esta forma o el estudio.

A T E N T A M E N T E.

Dra. Erika Coria Ramírez

Dr. Abraham Majluf Cruz.

Instituto Mexicano del Seguro Social

ANEXO 3

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Por medio de este conducto y luego de haber leído la carta de información pertinente, yo__

hago de su conocimiento que libre y voluntariamente he aceptado en participar en el proyecto de investigación **“EFECTO DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL ALTAMENTE EFECTIVA (HAART) SOBRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HOMOCISTEINA EN PACIENTES CON SIDA”**, que se realizará en el Hospital General Regional Gabriel Mancera de la Ciudad de México. Estoy consciente que para tal estudio es necesario que me sean extraídos 3 mL de sangre en una punción en ayuno y estoy enterado de los riesgos que esto implica. Es de mi conocimiento que la información que se obtenga de mi persona será confidencial y seré libre de retirarme del proyecto en el momento que yo así lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio. En caso de que decidiera retirarme, la atención que como paciente recibo en esta institución no se verá afectada.

A T E N T A M E N T E.

Nombre _____ **Firma** _____

Dirección _____ **Fecha** _____

Testigo _____

Dirección _____

Testigo _____

Dirección _____