



---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICOBIOLOGICAS**

**“DETERMINACIÓN DE LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS REGULADORAS DE  
LA COAGULACIÓN Y NIVELES DE HOMOCISTEÍNA EN ADULTOS MAYORES”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
QUIMICOBIOLOGICAS  
PRESENTA**

**Q.B.P. ARIANNA RODRÍGUEZ VILLA**

**DIRECTORES DE TESIS**

**DRA. ELBA REYES MALDONADO**

**DR. CÉSAR ZAVALA HERNÁNDEZ**

MÉXICO, D.F.

ENERO 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F., siendo las 10:00 horas del día 13 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

**Determinación de las principales proteínas reguladoras de la coagulación  
y niveles de homocisteína en adultos mayores**

Presentada por el alumno:

Rodríguez  
Apellido paterno

Villa  
Apellido materno

Arianna  
Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	0	3	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
Dra. Elba Reyes Maldonado

  
Dr. César Zavala Hernández

  
Dra. María del Rocio Elizabeth Ortiz Butrón

  
Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios

  
Dr. Edgar Hernández Zamora

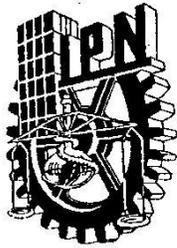
  
Dra. Lucía Quevedo Corona

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Manuel Jesús Piñón López



S.E.P.  
Escuela Nacional de  
Ciencias Biológicas  
Sección de Estudios  
de Posgrado  
e Investigación



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México D. F. el día 15 del mes de Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Arianna Rodríguez Villa alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B091013, adscrito a Escuela Nacional de Ciencias Biológicas , manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Elba Reyes Maldonado y el Dr. César Zavala Hernández y cede los derechos del trabajo intitulado Determinación de las principales proteínas reguladoras de la coagulación y niveles de homocisteína en adultos mayores, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [elbareyesm@gmail.com](mailto:elbareyesm@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

\_\_\_\_\_  
Dra. Elba Reyes Maldonado

\_\_\_\_\_  
Arianna Rodríguez Villa

## AGRADECIMIENTOS

Dra. Elba Reyes Maldonado (IPN)

Dr. César Zavala Hernández (I.N.R)

Dr. Edgar Hernández Zamora (I.N.R)

M. en C. Carlos Virgen Cruz (IL Diagnósticos)

Q.B.P Erika Rosales Cruz (IPN)

Q.F.B. Luis González Espínosa (IPN)

Por su invaluable ayuda en el desarrollo de este trabajo

Gracias:

A Dios

Por darme la vida, por haberme dado la sabiduría, fortaleza, salud, coraje, y no dejarme sola en los momentos difíciles, ayudarme a levantar en mis fracasos, por aprender de ellos y haberme permitido llegar a la meta en este gran proyecto, y por poner en mi camino a personas maravillosas.

A mis padres: Hugo Rodríguez y Leo Villa

Les dedico esta tesis por haberme brindado su comprensión, motivación y apoyo incondicional durante la realización de esta, por sus consejos que me orientaron a tomar las mejores decisiones y por impulsarme para lograr todas y cada una de mis metas, sueños y anhelos.

A mis hermanos: Diana y Hugo

Por ayudarme y apoyarme sin condiciones. Sé que cuento con ustedes por siempre.

A mis directores: Dra. Elba Reyes, Dr. César Zavala y Dr. Edgar Hernández  
Por toda la paciencia, apoyo, su valioso tiempo y por su conocimiento que me fueron de gran ayuda. Considero que fue mi mejor elección trabajar con ustedes y deseo contar siempre con su amistad.

A Héctor Salgado:

Por todo tu cariño, comprensión, apoyo y por estar conmigo en los momentos felices, tristes, logros, fracasos, y por impulsarme en momentos de declive y cansancio.

A mis amigas: Nubi, Jey, Pilar que aun estando lejos conservamos la amistad y a mis amigos de la maestría: Luis, Erika, Rosita, Anai, Luis Carlos, Ángeles, Ayerim, Marisol, Alicia, Mauricio, Alma, Beto, Erick, por todos los momentos que compartimos juntos las risas, fiestas, días de estudios, viajes, congresos, cumpleaños, santos, etc.

ARIANNA RODRIGUEZ VILLA

# ÍNDICE

	Pág.
Índice	i
Abreviaturas	ii
Índice de figuras	ii
Índice de tablas	iii
Resumen	iv
Abstract	
I. Introducción	
1.1. Antecedentes	1
1.2. Homocisteína	2
1.3. Metabolismo de la homocisteína	4
1.4. Causas de hiperhomocisteinemia	6
1.5. Defectos genéticos en el metabolismo de la homocisteína	6
1.5.1. Deficiencia de la enzima cistationina $\beta$ sintetasa	6
1.5.2. Deficiencia de la enzima metilenotetrahidrofolato reductasa	7
1.6. Deficiencias nutricionales	7
1.6.1. Deficiencias en la absorción de vitamina B12	7
1.7. Otras causas de hiperhomocisteinemia	7
1.8. Mecanismos de daño vascular en la hiperhomocisteinemia	8
1.9. Patologías asociadas a hiperhomocisteinemia	9
1.9.1. Aterosclerosis	10
1.9.2. Diabetes	11
1.9.3. Alzheimer	11
1.9.4. Demencia	12
1.9.5. Parkinson	12
1.9.6 Enfermedad cerebrovascular	12
1.10. Hiperhomocisteinemia y el mecanismo de coagulación	13
1.11. Proteína C	14
1.12. Proteína S	16

1.13. Antitrombina	16
2. Justificación	19
3. Hipótesis	19
4. Objetivos	19
4.1. Objetivos particulares	19
II. MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1. Tipo de Estudio	20
5.2. Material biológico	20
5.3. Criterios de selección	20
5.3.1. Criterios de inclusión	20
5.3.2. Criterios de exclusión	20
5.4. Metodología	20
5.4.1. Obtención de muestras	21
5.5. Determinación de Hcy, PC, PS y AT	22
5.5.1. Determinación de homocisteína por inmunoensayo	22
5.5.2. Determinación de proteína C por el método cromogénico	22
5.5.3. Determinación de proteína S por el método coagulométrico	23
5.5.4. Determinación de antitrombina por el método cromogénico	24
5.6 Extracción de DNA	24
5.7 Análisis Estadístico	25
III. RESULTADOS	26
IV. DISCUSIÓN	37
V. CONCLUSIONES	42
VI. REFERENCIAS	43
VII. ANEXOS	51

## ABREVIATURAS

AT	Antitrombina
CβS	Cistationina β sintasa
Gla	Gamma-carboxiglutamatos
Hcy	Homocisteína
HHC	Hiperhomocisteinemia
HTA	Hipertensión
IRC	Insuficiencia renal crónica
IVP	Insuficiencia venosa periférica
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
tHcy	Homocisteína total
THF	Tetrahidrofolato
PCa	Proteína C activada
PC	Proteína C
PS	Proteína S
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAHH	S-adenisil homocisteina hidrolasa
SAM	S-adenosilmetionina
t-PA	Activador tisular del plasminógeno

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
1 Estructura química de la Hcy	2
2 Metabolismo de la Hcy	5
3 Mecanismo de daño oxidativo de la Hcy	10
4 Activación endotelial de la PC e inactivación de los factores de coagulación	14
5 Mécanismo de acción de la AT	17
6 Niveles de Hcy en los pacientes	29
6 Niveles de Hcy en la población estudiada de acuerdo a los grupos de edad	30
7 Porcentaje de actividad de la PC en los grupos de edad	32
8 Porcentaje de actividad de la PS en los grupos de edad	33
9 Porcentaje de actividad de la AT en los grupos de edad	33
1 Causas de hiperhomocisteinemia	3
2 Implicaciones clínicas de la hiperhomocisteinemia	12
3 Características generales de la población estudiada	26
4 Patologías en el grupo de pacientes	27
5 Distribución de la población estudiada por grupos de edad	27
6 Distribución de la población estudiada por grupo de edad y género	28
7 Análisis de la distribución de variables por la prueba de Kolmogorov-Smirnov	28
8 Distribución de los valores de Hcy de la población estudiada de acuerdo al género y edad	29
9 Distribución de los valores PC, PS, y AT de la población estudiada de acuerdo al género	30
10 Distribución de los valores de PC, PS y AT en la población estudiada de acuerdo a la edad	31
11 Distribución de los valores obtenidos de la PC, PS y AT por edad y género	32
12 Correlaciones entre las variables	33
13 Asociación entre variables determinadas y padecimientos de los adultos mayores	33
14 Comparación entre grupo control y pacientes	34

## RESUMEN

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido originado del metabolismo de la metionina, que a concentraciones elevadas ( $>15 \mu\text{mol/L}$ ) se considera como factor aterogénico en diversas patologías. La hiperhomocisteinemia (HHC) ha recibido especial interés en años recientes, la frecuencia de HHC en la población general es de 5 al 10% y aumenta en adultos mayores hasta un 40%. La HHC causa daño y disfunción endotelial al generar especies reactivas de oxígeno, que promueven la trombosis, al incrementar la generación de trombina, disminuye la producción de óxido nítrico e inhiben la activación de las proteínas antitrombóticas: proteína C (PC), proteína S (PS) y antitrombina (AT). El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de Hcy y su asociación con el porcentaje de actividad de PC, PS y AT en adultos mayores, así como correlacionar los niveles de Hcy con las proteínas antitrombóticas y las patologías asociadas. Se estudiaron 115 participantes con edad de 50 a 98 años que acudieron al Servicio de Rehabilitación Geriátrica del I.N.R. y al Laboratorio de Investigación de Hematopatología del departamento de morfología de la ENCB, IPN. A todos ellos se les aplicó un cuestionario para conocer sus características generales, patologías asociadas e ingesta de medicamentos. Los que presentaron patologías fueron considerados como pacientes y quienes no presentaron ninguna, fueron considerados como controles. A ambos grupos (95 pacientes: 63 mujeres y 32 hombres y 20 controles: 13 mujeres y 7 hombres) se les determinaron: la concentración de Hcy en sangre por inmunoensayo automatizado y la actividad de PC, PS y AT por métodos coagulométricos y cromogénico mediante los sistemas de coagulación IL Diagnostics versión ACL Elite Pro. Los participantes se dividieron en grupos de edad de 50-59, 60-69, 70-79 y  $>80$  años. Se obtuvieron los siguientes resultados: el 24% de la población estudiada presentó aumento de Hcy el cual se correlacionó con la edad. Se obtuvo variación por género y grupos de edad para la actividad de PC y solo por grupos de edad para la PS. Se presentó correlación entre la actividad de PC-PS, PS-AT y PS-Hcy y, asociación entre la hipertensión (HTA) con la concentración de Hcy y AT, la insuficiencia renal crónica (IRC) con la concentración de Hcy y PC, así como entre la enfermedad vascular cerebral (EVC) y dislipidemias con la actividad de PC. La alta concentración de Hcy en sangre periférica afecta a la PS en adultos de 50 años o más, no así a la PC y AT.

## ABSTRACT

Homocysteine (Hcy) is an amino acid originated from the metabolism of methionine, which at high concentrations (>15 mmol/L) is considered as atherogenic factor in various pathologies. There has been particular attention focused on hyperhomocysteinemia (HHC) in recent years; high frequency of HHC in the general population ranges from 5% to 10% and increases in older adults up to 40%. HHC causes endothelial damage and dysfunction by generating potent reactive oxygen species that lead to thrombosis as it enhances thrombin generation, reduces nitric oxide production and inhibits the activation of antithrombotic proteins: protein C (PC), protein S (PS) and antithrombin (AT). The objective of this study was to determine the levels of Hcy and its association with PC, PS and AT levels in elderly people, as well as to correlate Hcy levels to antithrombotic proteins and associated pathologies. There were 115 participants aged from 50 to 98 attended at the Geriatric Rehabilitation Service INR and at the Research Laboratory on Hematopathology of the ENCB Morphology Department, IPN. All of them answered a questionnaire to obtain their general characteristics, associated pathologies and drug intake. The individuals, who were detected with pathologies, were considered as patients and those who did not have any, were considered as controls. In both groups (95 patients: 63 females, 32 males and 20 controls: 13 females, 7 males), the Hcy level in their blood was determined through automated immunoassay and the activity of PC, PS and AT was determined through chromogenic and coagulometric methods by using IL Diagnostics coagulation systems, ACL Elite Pro version. The participants were divided into groups according to their ages 50-59, 60-69, 70-79 and >80 year olds. The following results were obtained: 24% of the subjects showed HHC, with significant increase related to age. There was a significant variation related to gender and age for PC levels, and only to age for PS levels. A Correlation was obtained between PC-PS, PS-AT activity and PS-Hcy levels and association between hypertension (HTA) with Hcy and AT levels, chronic renal failure (CRF) with concentration of Hcy and PC as well as between cerebral vascular disease (CVD) and dyslipidemia with activity of PC. High homocysteine levels in peripheral blood significantly affect PS but not PC and AT, in 50 year old adults or older.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ANTECEDENTES

Las enfermedades cardiovasculares, particularmente la enfermedad coronaria, constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la mayor parte del mundo. En México, no es la excepción, la segunda causa de mortalidad en 2008 fueron las enfermedades isquémicas del corazón seguido por la enfermedad cerebrovascular (1). Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales son: hiperlipidemia, tabaquismo, diabetes mellitus e hipertensión arterial, los cuales no explican totalmente la prevalencia de las enfermedades coronarias, ya que hasta el 25% de los pacientes no tienen ninguno de estos factores. Entre los nuevos factores de riesgo destaca la hiperhomocisteinemia (HHC), como un factor independiente para la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares (2,3). La HHC ha recibido especial interés en años recientes, esta es el resultado de múltiples factores que interactúan entre sí o bien podrían ser independientes como son los problemas metabólicos, genéticos, nutricionales, enfermedades crónico degenerativas y uso de medicamentos, entre otras (4-6). McCully en 1969, fue el primero en describir la asociación entre HHC y patologías cardiovasculares. Así, propuso que la homocisteína (Hcy) podía influir para la aparición y desarrollo de las alteraciones cardiovasculares, fundamentado en estudios en los que examinó los tejidos de dos infantes en los que notó placas ateroscleróticas no asociadas con depósitos de grasa; basándose en estos hallazgos se consideró por primera vez, la posibilidad de una relación entre las enfermedades cardiovasculares y los niveles altos de Hcy (7). Jaques y col. reportaron un incremento en la concentración de Hcy con la edad y con niveles más altos en hombres que en mujeres (8). En pacientes con edades de 64 a 84 años también se ha encontrado una fuerte asociación entre niveles altos de Hcy con la edad, como un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, debido quizá al estado y niveles en los que se encuentran las vitaminas (9,10).

En la población adulta los cambios anatómo-fisiológicos propios del envejecimiento, hacen de los adultos mayores, un grupo vulnerable a la mala nutrición y deficiencias específicas de nutrientes como la vitamina B<sub>12</sub> y el folato que son fuertes determinantes de la concentración de la Hcy (11). En México, la prevalencia de las deficiencias de vitamina B<sub>12</sub> y los niveles séricos de folato es alrededor de 19-41% en adultos y niños, y no se cuenta con información para el grupo etéreo de adultos mayores a pesar de ser una población susceptible de riesgo de deficiencia (12).

## 1.2 HOMOCISTEÍNA

La Hcy es un aminoácido con un grupo sulfhidrilo susceptible de oxidación a pH fisiológico (Figura 1). En el plasma, la Hcy el 1% aproximadamente se encuentra en forma reducida; cerca del 70% se encuentra unida a albúmina y, el resto 29%, formando compuestos disulfuro de peso molecular bajo. La suma de todas estas especies de Hcy es denominada Hcy total (tHcy) (13). La Hcy no es un constituyente de la dieta, es un producto intermediario de la producción de cisteína; se forma exclusivamente por desmetilación de metionina, este aminoácido desempeña un papel importante en la transferencia de grupos metilo en el metabolismo celular (3).

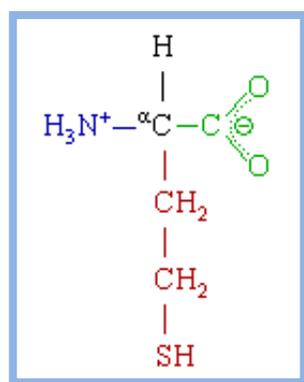


Figura 1. Estructura química de la Hcy.

El proyecto de la acción concertada Europea de Hcy y enfermedades vasculares ha reconocido como rangos normales de Hcy total de 5 a 15  $\mu\text{mol/L}$ , aunque muchos autores consideran que el límite superior de variación normal debe ser de 10 a 12

µmol/L. Se ha denominado hiperhomocisteinemia a valores plasmáticos de Hcy total mayores a 15 µmol/L (14-16).

En general, se acepta que los determinantes de la HHC son complejos e incluyen factores muy diversos de carácter demográfico, genético, adquiridos, nutricionales, problemas metabólicos, enfermedades crónicas, fármacos, hábito de fumar, ingesta alimenticia baja de vitaminas, consumo elevado de alcohol o café y actividad física escasa (Tabla 1) (17-19).

<b>TABLA 1. CAUSAS DE HIPERHOMOCISTEINEMIA <sup>(17)</sup></b>
<b>DEFICIENCIAS ENZIMÁTICAS Y MUTACIONES</b> Cistationina – sintetasa Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) Metionina sintetasa
<b>MUTACIONES DE LA VITAMINA B12</b>
<b>DEFICIENCIAS NUTRICIONALES</b> Ácido fólico Vitamina B12 Vitamina B6
<b>ENFERMEDADES CRÓNICAS</b> Insuficiencia renal crónica Lupus eritematoso sistémico hipotiroidismo Diabetes mellitus Enfermedad intestinal inflamatoria Neoplasias Psoriasis
<b>FÁRMACOS</b> Anticonvulsivantes (hidantoína, carbamazepina) Hipolipemiantes (colestiramina, colestipol, ácido nicotínico) Metotrexate Teofilina Ciclosporina
<b>DIETA HIPERPROTEICA</b> Aumento de consumo de metionina

### 1.3 METABOLISMO DE LA HCY

La metionina es un aminoácido indispensable involucrado en la síntesis de proteínas, la formación de adenosilmetionina y la síntesis de Hcy (20). Metabólicamente, la Hcy es importante en el reciclamiento del folato intracelular, en el catabolismo de colina y betaína, y en la formación de cistationina y cisteína (21). La Hcy se metaboliza fundamentalmente a través de 2 vías: la remetilación y la transulfuración (22).

En la remetilación, la Hcy se convierte a metionina. En esta serie de reacciones está presente el tetrahidrolfolato (THF). Primero el 5,10-metileno THF es convertido a 5-metileno THF por la enzima metilentetrahidrolfolato reductasa (MTHFR). El N-5-metilTHF sirve como donador del grupo metilo, para la formación de Hcy a metionina y THF. Esta reacción catalizada por la 5-metiltetrahidrolfolato-homocisteína-metiltransferasa (metionina sintetasa) requiere de vitamina B12 como sustrato. El grupo metilo unido a la vitamina B12 (metil-B12) se forma en una serie de reacciones de coenzimas de cobalamina. Alternativamente, el grupo metilo puede ser donado por betaína en una reacción catalizada por betaína-homocisteína-metiltransferasa, formando dimetil glicina y metionina (23).

La vía de la transulfuración da lugar a la formación de cisteína (24). A través de esta vía la Hcy se transforma en cisteína, para lo cual se requiere de vitamina B6 y de la enzima cistationina  $\beta$  sintasa (C $\beta$ S). Esta vía se activa cuando hay concentraciones elevadas de metionina (que proviene de la dieta), ésta es convertida a Hcy a través de 2 intermediarios: la S-adenosilmetionina (SAM) y la S-adenosilhomocisteína (SAH). SAM incrementa la actividad de C $\beta$ S, mientras que la enzima MTHFR la disminuye, promoviendo el metabolismo de Hcy por la vía de la transulfuración: al activar esta vía, la regulación conduce a la formación de metionina, está a su vez se transforma nuevamente a Hcy que se condensa con serina para formar cistationina, catalizando la reacción la C $\beta$ S. La cistationina se transforma a cisteína y acetobutarato a través de la acistationasa, dependiendo estas reacciones de vitamina B6 como cofactor. El exceso de cisteína se oxida a taurina y sulfatos inorgánicos excretados en la orina (25) (Figura 2).

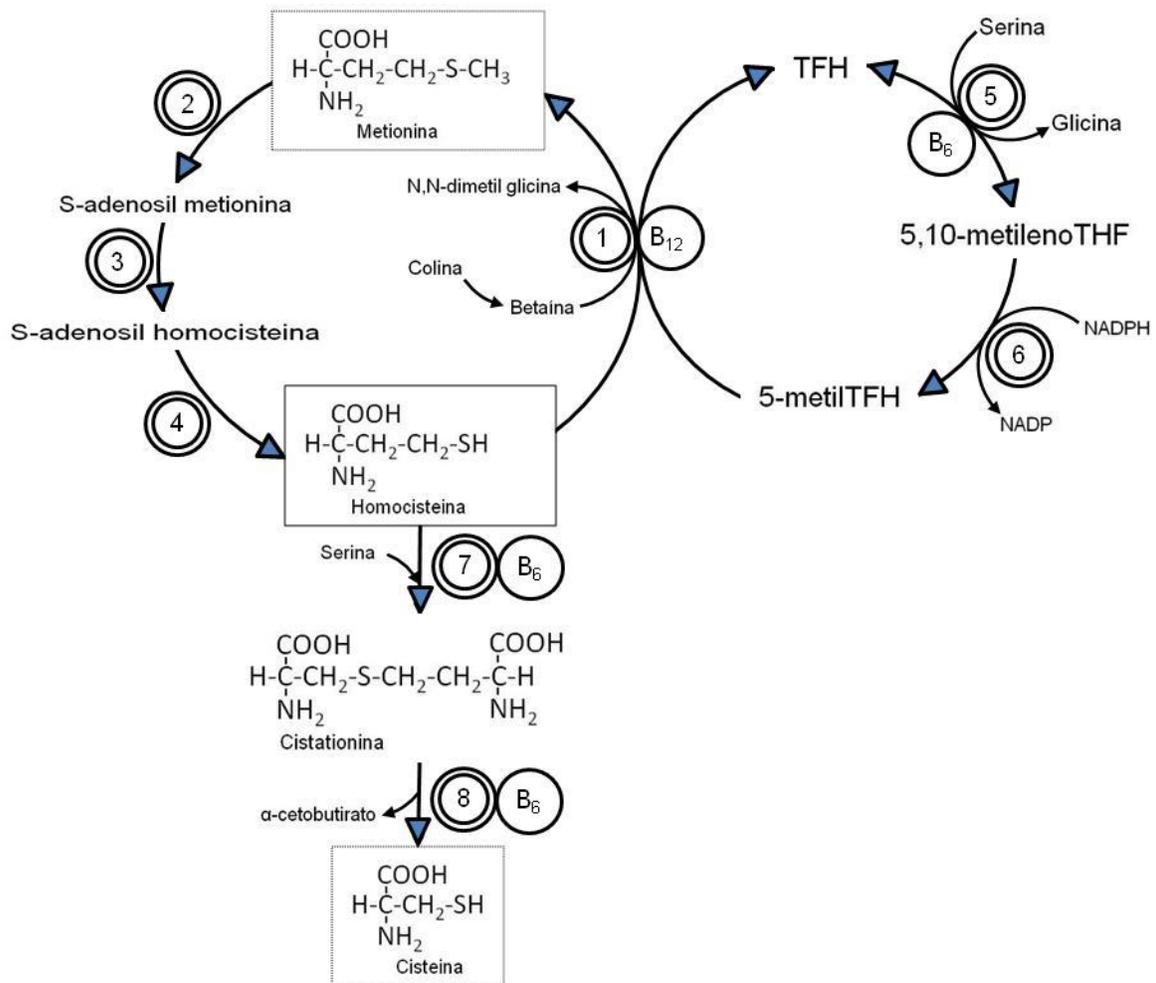


Figura 2. Metabolismo de la homocisteína, a través de 2 vías: remetilación y transulfuración. Transulfuración: 1. Metionina sintasa; 2. Metionina adenosiltransferasa; 3. Metiltransferasa; 4. S-adenosilhomocisteína cisteinasa; 5. Serina hidroximetiltransferasa, cofactor fosfato de piridoxal (PLP,  $\text{B}_6$ ); 6. Metilnotetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Remetilación: 7. Cistationina- $\beta$ -sintasa ( $\text{C}\beta\text{S}$ ) y 8.  $\gamma$ -cistationasa. Ambas utilizan como cofactor a la vitamina  $\text{B}_6$ .

Se ha demostrado que en dietas bajas en proteínas, incrementa la remetilación y disminuye la transulfuración con objeto de conservar metionina (26). También, se ha descrito que la concentración de SAM regula la remetilación de Hcy para conservar grupos metilo en forma de metionina, y que incrementa la transulfuración de Hcy para la formación de cisteína cuando no se necesitan grupos metilo. Por otra parte, el consumo continuo de betaína produce disminución de los niveles

plasmáticos de Hcy, ya que incrementa la remetilación de Hcy y la transulfuración subsecuente de la misma (27).

En el plasma normalmente existen concentraciones muy pequeñas de Hcy (<10  $\mu\text{mol/L}$ ), debido a que existe un mecanismo excretor celular de este aminoácido. Con este mecanismo, se completa el catabolismo de Hcy por la vía de transulfuración, lo que mantiene baja la concentración intracelular de este aminoácido potencialmente citotóxico (28).

#### **1.4 CAUSAS DE HIPERHOMOCISTEINEMIA**

Como ya se mencionó la HHC es el resultado de la interacción entre factores genéticos, metabólicos, dietéticos, enfermedades crónicas, entre otros (Tabla 2). Además, existen otros factores como enfermedades sistémicas y fármacos que igualmente contribuyen a su aparición. Se plantean 3 grupos de causas: de origen genético, por deficiencias nutricionales y otras causas (22).

#### **1.5 DEFECTOS GENÉTICOS EN EL METABOLISMO DE LA HCY**

La HHC puede presentarse por deficiencias genéticas de enzimas en la vía de la Hcy, siendo dos los componentes más afectados, la enzima C $\beta$ S y MTHFR (25).

**1.5.1 Deficiencia de la cistationina  $\beta$  sintetasa:** Esta enzima es el catalizador principal de la vía de la transulfuración, el gen de C $\beta$ S se localiza en el cromosoma 21 (21q22.3) y se han descrito más de 60 mutaciones (29), las mutaciones en el gen que codifica para esta enzima, alteran el metabolismo conduciendo a una homocisteinuria congénita, conocida también como clásica o de tipo I. La forma homocigota de la enfermedad puede asociarse con concentraciones de Hcy en ayuno mayores de 400  $\mu\text{mol/L}$ , se presenta con homocisteinuria y aterosclerosis prematura con pronóstico negativo (30). Los heterocigotos para esta deficiencia

enzimática tienen concentraciones mucho más bajas de Hcy, entre 20 a 40  $\mu\text{mol/L}$  (31).

**1.5.2 Deficiencia de metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR):** Esta enzima cataliza la reducción de 5,10- metileno tetrahidrofolato a 5- metileno tetrahidrofolato, el cual es necesario para la actividad de la metionina sintasa para convertir Hcy a metionina. Las mutaciones a nivel del gen que codifican para esta enzima, se consideran factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares y defectos del tubo neural (32,33). Se han descrito dos variantes enzimáticas de la MTHFR: termoestable y termolábil. En la primera, se hereda de carácter autosómico recesivo, el gen se localiza en el cromosoma 1 (1p36.3) y se han descrito 9 mutaciones puntuales, es más importante la variante termolábil, considerada la forma genética más común de HHC, resulta de una mutación puntual (C677T) que conduce a la sustitución de alanina por valina (34).

## **1.6 DEFECTOS NUTRICIONALES**

Las vitaminas B12, B6 y ácido fólico juegan un papel importante en el metabolismo de la Hcy como coenzimas. Se sabe que, a bajas concentraciones por una mala ingesta o problemas de absorción alteran la actividad de las enzimas, reduciéndose o nulificándose de esta forma la acción catalítica de éstas. Los niveles plasmáticos de folatos y vitamina B12 son fuertes determinantes de la concentración de Hcy y la HHC puede reflejar en cierta forma deficiencias de folatos, piridoxina y cobalamina (35). Dichas deficiencias se han asociado con un alto riesgo de enfermedad cardiovascular, independientemente de los factores de riesgo convencionales (36).

**1.6.1 Deficiencia en la absorción de vitamina B12.** Esta vitamina en su forma activa como metilcobalamina participa en la transferencia de grupos metilo como coenzima de la metionina sintasa. Para la absorción de esta vitamina se requiere de una proteína llamada factor intrínseco, que se sintetiza a nivel de la mucosa

gástrica. La deficiencia de este factor, además de alterar la disponibilidad de la vitamina, se acompaña de anemia perniciosa (2).

### **1.7 OTRAS CAUSAS.**

- ❖ Enfermedad crónica renal. Existe una correlación positiva entre los niveles de Hcy y los de creatinina. La HHC en los pacientes con insuficiencia renal es causada por disminución del metabolismo a nivel renal y, en menor medida, por reducción de su excreción. Los niveles plasmáticos de Hcy se elevan de 2 a 4 veces en pacientes con insuficiencia renal crónica, lo cual se correlaciona con la concentración sérica de creatinina y albúmina (37).
- ❖ Cáncer. Se han reportado niveles plasmáticos altos de Hcy en pacientes con diferentes tipos de carcinoma, fundamentalmente de mama, ovario y páncreas; así como leucemia linfoblástica aguda. Esto puede explicarse a partir de la observación experimental de que células transformadas en cultivo no son capaces de metabolizar la Hcy (38,39).
- ❖ Hábitos tóxicos. Se encontró asociación entre el tabaquismo y consumo excesivo de café con la aparición de HHC, probablemente por interferencia con la síntesis de piridoxal fostato. También, el alcoholismo crónico se ha reportado como causal de elevación plasmática de Hcy, esto parece deberse al déficit nutricional de estos pacientes (18).
- ❖ Fármacos: Existen diversos fármacos que interfieren con el buen funcionamiento de las vitaminas como coenzimas de las reacciones involucradas en el metabolismo de la Hcy, por mencionar algunos ejemplos: fármacos empleados en el tratamiento de hiperlipemias como son el colestipol y el ácido nicotínico, afectan el proceso de absorción del ácido fólico. El metotrexate, que se emplea en el tratamiento del cáncer posee cierta actividad inhibitoria de la folato reductasa. La difenilhidantoína, que se emplea como anticonvulsivante interfiere en el metabolismo del ácido fólico (17).
- ❖ Cambios fisiológicos del envejecimiento. Los cambios anatómo-fisiológicos propios del envejecimiento debido a la declinación funcional de los órganos y sistemas, se observa una disminución de la sensibilidad de los sentidos del gusto y el olfato, lo cual afecta el interés por los alimentos y por ende el apetito

(40), por esta razón, los adultos mayores son un grupo vulnerable a los estados de mal nutrición y deficiencias específicas de nutrientes como la vitamina B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> y el folato (41). Estas vitaminas son esenciales para el metabolismo de la Hcy, deficiencias en estas vitaminas se han asociado con alteraciones en los niveles de Hcy (42).

Para el 2040 la población de adultos mayores aumentará 230% en México, según el censo difundido por el Instituto Nacional de Envejecimiento de Estados Unidos (NIA). El proceso de envejecimiento se acompaña de una serie de cambios, que alteran la capacidad física del individuo y también los hábitos y conductas alimentarias del adulto mayor (43).

### **1.8 MECANISMO DE DAÑO VASCULAR EN LA HHC**

Existen múltiples mecanismos por los cuales la Hcy puede producir lesión vascular, las características, químicas de su molécula pueden ser los causantes de dicho daño, ya que esta contiene un átomo de azufre muy reactivo que se oxida rápidamente y forma residuos del aminoácido cisteína (44). Durante la autoxidación de Hcy se generan potentes especies reactivas del oxígeno, como son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el anión hidroxilo. Una vez formadas las especies reactivas de oxígeno pueden actuar de varias maneras, provocando una disfunción endotelial al alterar la vía del óxido nítrico (NO): la exposición por largo tiempo de las células endoteliales a la Hcy puede producir una disminución de la disponibilidad de NO, aumento en la activación de plaquetas: aumentando la agregación plaquetaria y la formación de coágulos (15,37). Además, estimula la proliferación de células del músculo liso endotelial, promoviendo la trombosis al incrementar la generación de trombina y adhesividad de neutrófilos y monocitos al endotelio; otros mecanismos asociados a esta exposición son la inhibición de síntesis de prostaciclina, activación del factor V, X y XII de la coagulación, peroxidación de los lípidos de las lipoproteínas plasmáticas, fundamentalmente de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), favoreciendo el desarrollo de aterogénesis, concentración elevada de triglicéridos, inhibe la expresión de

trombomodulina e inhibe la activación de las proteínas antitrombóticas proteína C (PC), proteína S (PS) y antitrombina (AT) (Figura 3) (45-47).

Los mecanismos precisos por los cuales la HHC produce estos efectos no son claros, pero se sugiere que la Hcy inicia una cascada inflamatoria que puede llevar a la pérdida o degradación de la función biológica de múltiples enzimas, receptores, factores de crecimiento y proteínas estructurales al modificar la metilación del DNA y alterar la estructura de proteínas asociadas a la membrana celular (47,48).

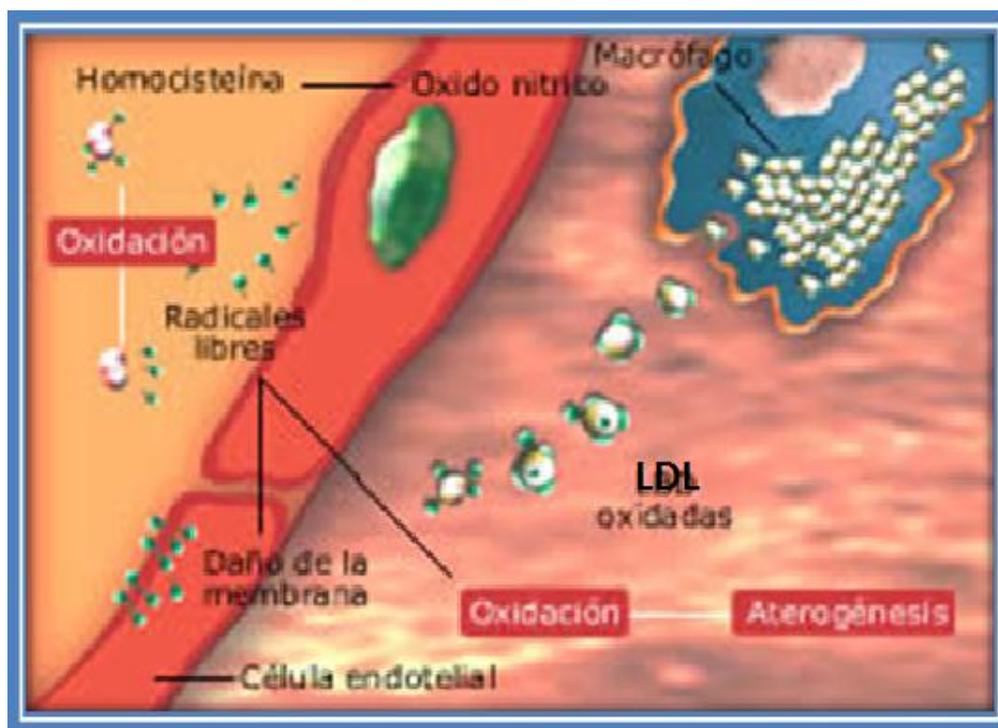


Figura 3. Mecanismo de daño oxidativo de la Hcy. La Hcy induce disfunción endotelial al bloquear la síntesis de óxido nítrico. Además, al oxidarse libera radicales libres que lesionan las membranas de las células endoteliales. (49)

## 1.9 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A HHC

### 1.9.1 Aterosclerosis

La HHC se asoció inicialmente con la aterosclerosis por diferentes hallazgos en autopsias de pacientes con defectos genéticos de tipo homocigótico en las enzimas necesarias para el metabolismo de la Hcy, como son la C $\beta$ S y MTHFR. En pacientes con dichos defectos, hubo un desarrollo de aterosclerosis severa y varios

de ellos tuvieron su primer infarto de miocardio alrededor de los 20 años (7). Al parecer existe una clara asociación entre la concentración plasmática de la Hcy y la extensión anatómica de la aterosclerosis, tanto del territorio coronario, como carotídeo y de las extremidades inferiores (50). Se ha demostrado una asociación entre la HHC y el daño endotelial; en experimentos de cultivo celular, la adición de Hcy al medio induce un desprendimiento celular de las monocapas de células endoteliales y anomalías en la liberación de óxido nítrico (51).

### **1.9.2 Diabetes**

Estudios realizados en ratas por McCarty, describen la posibilidad que la hiperinsulinemia suprima la expresión de la enzima C $\beta$ S incrementando la concentración de Hcy (52). La HHC se ha descrito tanto en pacientes con diabetes tipo 1 como tipo 2, aunque es más prevalente y se asocia con un mayor riesgo cardiovascular en estos últimos. En la diabetes tipo 1 la presencia de complicaciones microangiopáticas y macroangiopáticas, así como la neuropatía periférica, son más frecuentes en los sujetos con HHC. La relación exacta entre la HHC, la macroangiopatía y la enfermedad renal en la diabetes tipo 2 aún no se conoce; no obstante, la prevalencia superior de macroangiopatía en los diabéticos con HHC se asocia con mayor prevalencia de nefropatía, que por sí misma también puede contribuir al desarrollo de la macroangiopatía. Además, los pacientes con HHC suelen presentar hipertensión y dislipidemia, factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la macroangiopatía (53,54).

### **1.9.3. Alzheimer**

Seshadri y col. en el 2002, reportaron que la HHC por si sola puede causar daño a las neuronas a altas concentraciones, en estudios prospectivos en pacientes con incremento de los niveles de Hcy por arriba de los rangos normales, se incrementa el riesgo de padecer Alzheimer en un 40%. Dicha asociación parece ser independiente de otros factores tales como la edad, sexo, niveles de vitamina plasmática, etc (55).

#### **1.9.4. Demencia**

Estudios realizados con pacientes de edad avanzada reportan que las personas con concentraciones plasmáticas de Hcy por arriba de los 14  $\mu\text{mol/L}$  tiene el doble de riesgo de presentar demencia, comparados con aquellas con valores normales. Por otro lado, se ha encontrado una marcada asociación inversa entre los niveles de Hcy y las funciones cognitivas (56). La relación entre la HHC y la demencia ha sido un tema importante en varios estudios, en los que se fundamenta que ésta puede promover el desarrollo de la demencia por mecanismos tales como: promoción de microangiopatía cerebral, estimulación de neurotoxicidad dependiente de proteína  $\beta$  amiloide y estimulación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (57).

#### **1.9.5 Parkinson**

En los últimos años la enfermedad de Parkinson se ha relacionado con la HHC, fundamentalmente debido a que durante el metabolismo de la Hcy se forma el sustrato S-adenosilmetionina, quien juega un papel de donador de grupos metilo en el sistema nervioso central. Por tanto, las alteraciones que se presenten en la producción de dicho sustrato tendrán impacto en el desarrollo, diferenciación y función celular, como es el caso de la disminución de los procesos de metilación que se han reportado en trastornos psiquiátricos y neurológicos (58).

#### **1.9.6 Enfermedad cerebrovascular**

Diversos estudios clínicos y epidemiológicos en los últimos años, muestran que una elevación moderada de Hcy constituye un factor de riesgo independiente para padecer enfermedad vascular, dicha vinculación se fundamenta en que la Hcy puede causar daño a la matriz vascular, propiciando mecanismos oxidativos con la subsecuente disminución de la acción antitrombótica del endotelio y propagación en el músculo liso (59,60).

## 1.10 HHC Y EL MECANISMO DE COAGULACIÓN

Diversos estudios experimentales sugieren que la trombogenicidad de la HHC reside en su capacidad para modificar la resistencia endotelial a la trombosis por diversos mecanismos a los que siguen la activación plaquetaria y formación de trombos. En la tabla 2, se muestran las implicaciones clínicas de la HHC asociadas a hipercoagulabilidad en la trombosis arterial y venosa (61).

<b>TABLA 2. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA HHC <sup>(61)</sup>.</b>
<b>Aterotrombosis</b>
<b>Infarto agudo al miocardio</b>
<b>Progresión de enfermedad coronaria conocida</b>
<b>Enfermedad vascular cerebral isquémica</b>
<b>Enfermedad arterial periférica</b>
<b>Enfermedad tromboembólica venosa</b>
<b>Trombosis venosa profunda</b>
<b>Trombosis venosa cerebral</b>
<b>Tromboembolismo pulmonar</b>
<b>Enfermedad vascular cerebral</b>
<b>Complicaciones obstétricas</b>
<b>Preeclampsia grave</b>
<b>Parto pretérmino</b>
<b>Retardo en el crecimiento fetal</b>
<b>Defectos del tubo neural</b>

El proceso de coagulación comprende la hemostasia y la fibrinólisis (62). La hemostasia es un proceso fisiológico que mantiene la sangre en estado líquido, mientras que induce la formación de un tapón hemostático en los sitios donde hay lesión vascular; una alteración en este proceso llevará a la formación de trombosis (63).

La trombosis es la obstrucción local del flujo de sangre por una masa en algún vaso arterial o venoso, los tejidos irrigados por este vaso sufren isquemia. Hay un desequilibrio en la inducción de un tapón hemostático en el lugar de la lesión, llevando a una activación inapropiada de los procesos homeostáticos normales,

como la formación de trombos en la vasculatura no lesionada o la oclusión trombótica de un vaso tras una lesión menor (64).

Las alteraciones de la hemostasia relacionadas con un riesgo trombótico aumentado son debidas al déficit de anticoagulantes naturales: PC y PS o AT. Los factores de coagulación son activados por proteasas de serina, y su actividad está modulada por varios inhibidores naturales plasmáticos. Los inhibidores más importantes del sistema de coagulación de la sangre son la AT, PC y PS (65).

### **1.11 Proteína C**

La PC de la coagulación, es una proteína dependiente de vitamina K que consta de 461 aminoácidos, sintetizada en el hígado como zimógeno (forma inactiva); tiene un peso molecular de 63,000 daltones, contiene residuos de gamma-carboxiglutamatos (Gla), se activa por un complejo de trombina unido a membrana, la trombomodulina y calcio. El gen que codifica para su síntesis se encuentra en el cromosoma 2 y consta de 11 kb compuesto por 9 exones (66). La PC se activa (PCa) por la trombina en presencia de un cofactor de las células endoteliales, llamado trombomodulina (67). La región catalítica de la PCa contiene His 211, Asp 257 y Ser 360 (triada catalítica) que inactiva a los factores Va y VIIIa (68), y es por ello que la PCa tiene una importante función inhibidora de la actividad procoagulante (Figura 4). El efecto neto de la activación de la PC es disminuir la síntesis de trombina (69).

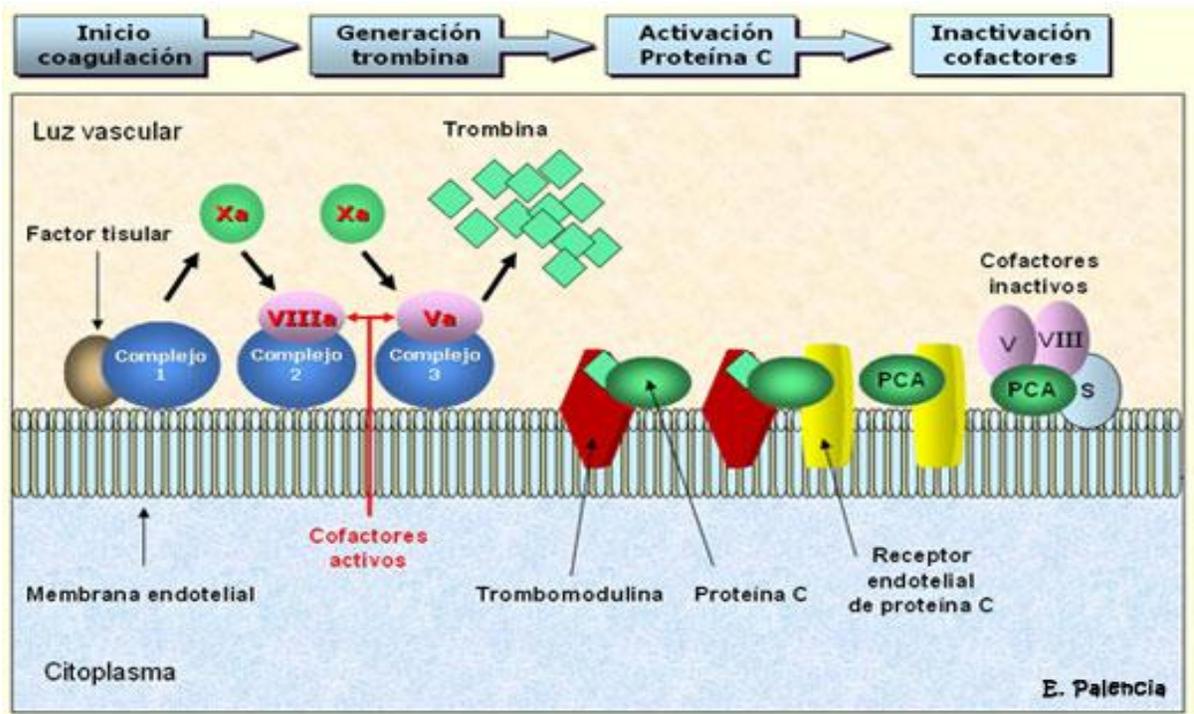


Figura 4. Activación endotelial de la PC e inactivación de factores de coagulación. La trombomodulina impide la acción procoagulante de la trombina y favorece la activación de la proteína C (PC) y posterior inactivación del factor Va y factor VIIIa. la proteína S facilita la función antitrombótica de la proteína C (70).

Por otro lado, la PCa a través de la activación del receptor I activado por proteasas sobre las células endoteliales, estimula la liberación de t-PA aumentando el potencial fibrinolítico de la sangre. Su concentración plasmática es de 4  $\mu\text{g/mL}$ , con una funcionalidad del 70 al 140% y una vida media de 10 h (70)

El principal efecto de la PCa es inactivar los factores de coagulación Va y VIIIa, que son necesarios para la generación de trombina y el factor X activado. El efecto inhibitor de la PCa es notablemente aumentado por la PS, otra proteína dependiente de vitamina K. Desde el punto de vista clínico, se presenta algún evento trombótico en el 75% de los individuos con deficiencia de la PC. Los pacientes heterocigotos para la deficiencia de la PC suelen tener una concentración inferior al 60% de lo normal (71).

### **1.12. Proteína S**

La PS es una glicoproteína con un peso molecular de 70,000 daltones. Se sintetiza en el endotelio, megacariocitos e hígado, en este último requiere de vitamina K. Los genes que la codifican se encuentran localizados en el cromosoma 3 (72). En condiciones fisiológicas un 60% de la PS está unida reversiblemente a la proteína de unión de la fracción 4 del complemento por lo que solamente el 40% que queda libre es funcional. Actúa como cofactor de la PCa al facilitar su unión a las membranas fosfolipídicas y favorecer la inhibición de los factores Va y VIIIa. Su concentración plasmática es de 20 a 25 µg/mL, con una funcionalidad del 63-135% y una vida media de 8 horas (73).

Se une a la PC sobre la superficie de la plaqueta o de las células endoteliales, donde este complejo molecular inhibe a los factores Va y VIIIa (74), integrados en los complejos activadores de los factores X y II. De esta manera las enzimas IXa y Xa son amortiguadas por el sistema de la AT y los cofactores Va y VIIIa por el sistema de la PC como enzima, y la PS como coenzima (Figura 4) (70).

El sistema de trombomodulina/PC y S, es fundamental en la fisiología de la hemostasia ya que regula a tres importantes proteínas procoagulantes: trombina, factor Va y factor VIIIa (75).

La deficiencia de la PS se hereda en forma autosómica dominante, aproximadamente el 72% de los heterocigotos para la deficiencia, presentan enfermedad tromboembólica venosa y el 56% de estos episodios son espontáneos (76). La deficiencia clásica de la PS consiste en una disminución de los niveles antigénicos de la PS total, con mayor reducción en PS libre tanto antigénica como funcional; existen por lo menos 69 mutaciones distintas asociadas a la deficiencia de la PS (77).

### **1.1.3 Antitrombina**

La AT (también descrita como antitrombina III) es una  $\alpha_2$  glicoproteína plasmática de peso molecular de 68,000 daltones, que se sintetiza en el hígado en una serie

de reacciones que no requieren de vitamina K; también, se sintetiza en células endoteliales (71). Posee un contenido de carbohidratos de 9 al 15,2 por ciento y el resto lo forma la fracción peptídica, que se compone de una cadena sencilla de glicoproteína sin puentes disulfuro. El residuo N terminal de la cadena polipeptídica, corresponde a la histidina y los residuos de arginina, a los sitios activos. El gen que controla su síntesis se encuentra en el cromosoma 1, consta de 7 exones (66).

Se han descrito, seis actividades antitrombónicas diferentes: AT I: se refiere a las adsorción de la trombina a la fibrina, AT II: es el cofactor plasmático de la heparina, AT III: ha sido utilizada para denominar la actividad plasmática que produce la inactivación progresiva e irreversible de la trombina., AT IX: usada por Seegers y col. para describir una actividad contra la trombina en el proceso de coagulación y AT VI: se refiere a la actividad de los productos de degradación del fibrinógeno, que interfiere en la reacción de la trombina con el fibrinógeno (78).

La AT es un inhibidor de las proteasas de serina que juega un papel importante en el proceso de coagulación ya que inactiva directamente a la trombina y también inactiva los factores IX, X, XI y XII formando un complejo covalente. La inhibición de los factores es lento, sin embargo, la unión de la heparina a la AT III acelera la inactivación de la trombina, observándose que en ausencia de heparina la vida media de la trombina es de 40 segundos y en presencia de AT III y heparina, es de 20 segundos (79). La heparina interacciona con los residuos de lisina de la AT III y produce un cambio conformacional, que favorece la exposición de los residuos de arginina de la AT III y produce un cambio conformacional, que favorece la exposición de los residuos de arginina de la AT III, los que así interaccionan más fácilmente con la trombina (Figura 5). Su concentración plasmática promedio es de 140 µg/mL, con una funcionalidad del 75,6 al 122,4% y una vida media de 48-60 horas (80).

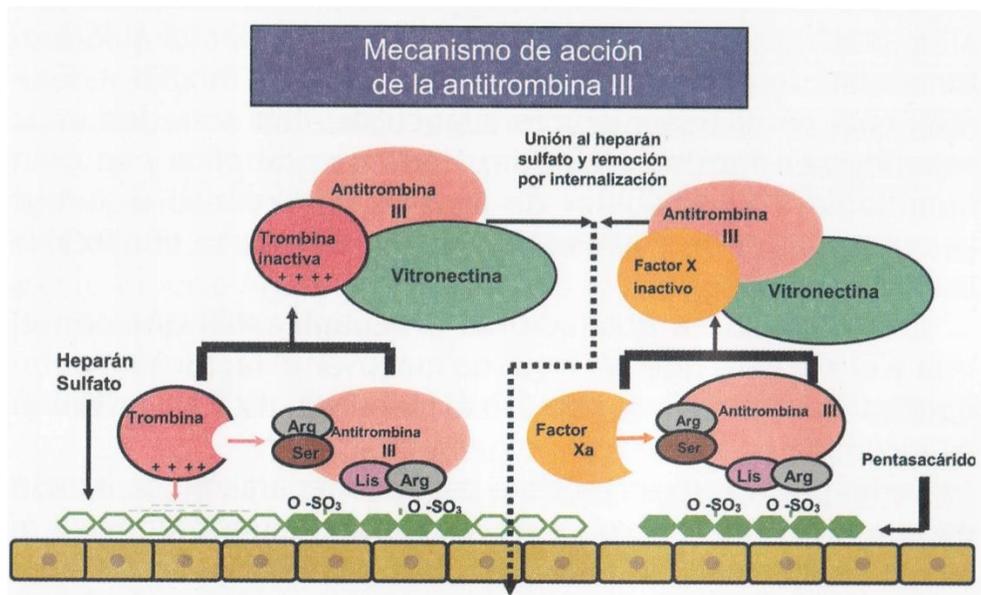


Figura 5. Mecanismo de acción de la AT. La unión de la antitrombina con las proteasas de serina como el factor Xa y la trombina es incrementada notablemente por la acción de heparinoides como el heparán sulfato (70).

La deficiencia de AT se hereda como un rasgo autosómico dominante y por lo tanto, afecta ambos sexos por igual. Los individuos afectados presentan enfermedad tromboembólica venosa aproximadamente en el 55% de los casos (81).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

No hay estudios a nivel nacional ni internacional acerca de los valores de Hcy, PC, PS y AT en adultos mayores. Sin embargo, si conocemos estos valores, se podrá realizar un mejor tratamiento para los problemas de coagulación en este tipo de población, pues el riesgo de padecer alguna alteración de la coagulación en la HHC en los individuos de edad adulta es mayor, además en los próximos años sera la población más frecuente en nuestro país. Como ya es conocido, la Hcy es un agente altamente oxidante para los sistemas biológicos, y altera las proteínas del sistema de la coagulación, por lo que es importante conocer cómo se encuentran los niveles de Hcy, PC, PS y AT en nuestra población de adultos mayores.

## **3. HIPÓTESIS**

Los niveles bajos de actividad de las proteínas C, S y AT en adultos mayores de 50 años se producen por los niveles altos de Hcy.

## **4. OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Determinar la actividad de la PC, PS y AT y su asociación con los niveles de Hcy en adultos mayores.

### **ESPECÍFICOS**

- Determinar los niveles de Hcy y los niveles de actividad de la PC, PS y AT en adultos mayores.
- Correlacionar los niveles de Hcy con los niveles de actividad de las proteínas antitrombóticas.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Tipo de estudio**

Estudio descriptivo, transversal y analítico.

### **5.2 Material biológico**

La selección de los participantes se llevó a cabo por muestreo probabilístico. Se incluyeron 115 participantes que acudieron al Servicio de Rehabilitación Geriátrica y al Laboratorio de Investigación en Hematopatología del Depto de Morfología de la ENCB del Instituto Politécnico Nacional, mayores de 50 años y que decidieron participar en el protocolo, considerando tanto a los casos de primera vez o subsecuentes, hasta completar 115 participantes de ambos géneros.

### **5.3 Criterios de selección**

#### **5.3.1. Criterios de Inclusión:**

- \*Mayores de 50 años de edad
- \*Ambos géneros
- \*Que acepten participar en el estudio

#### **5.3.2. Criterios de exclusión:**

- \*Que decida no participar en el protocolo

### **5.4. Metodología**

#### **5.4.1 Obtención de muestras**

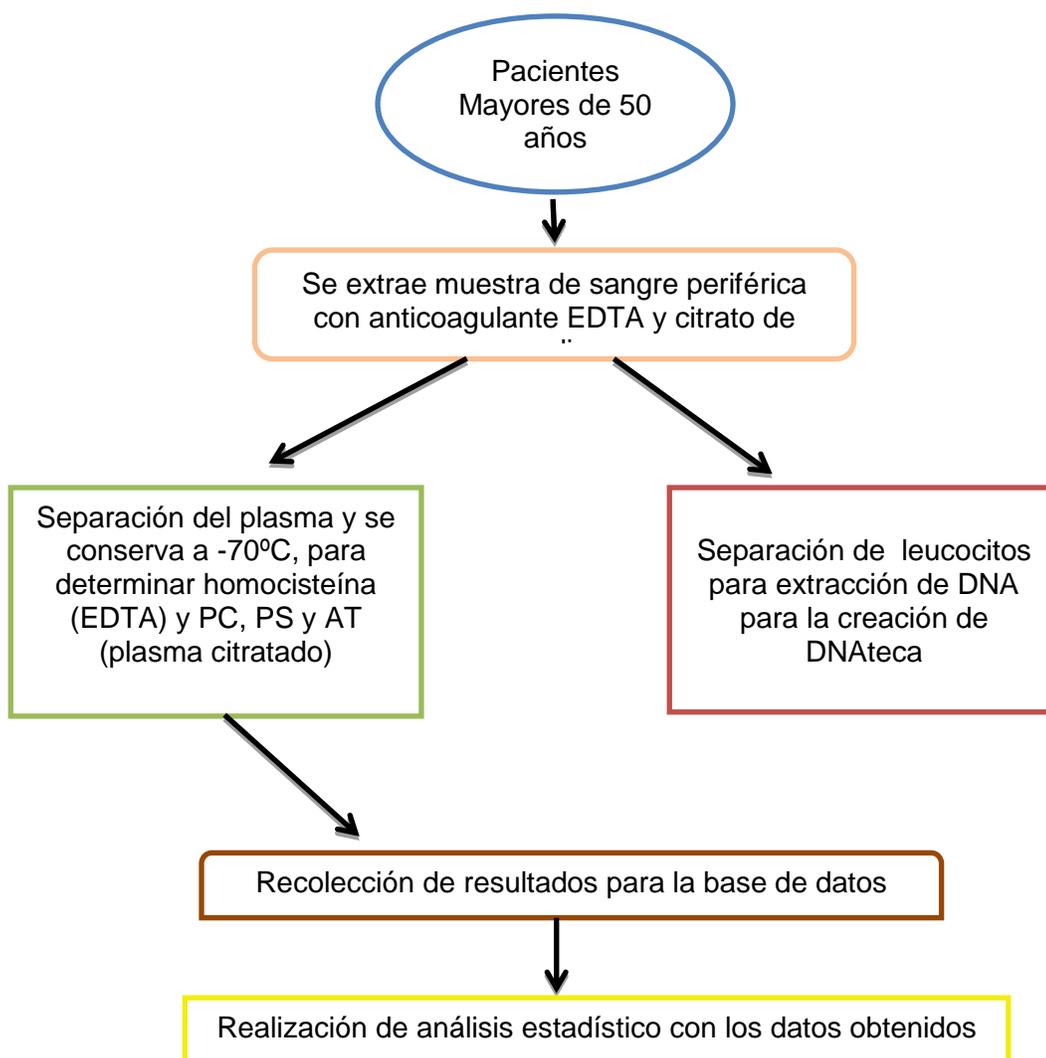
Los participantes se captaron al acudir a consulta de Rehabilitación Geriátrica en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y al Laboratorio de Investigación en Hematopatología, y a quienes se les invitó a participar. Una vez que aceptaron participar firmando la carta de consentimiento informado (anexo I), se obtuvieron sus datos (anexo II), una vez concluido, los pacientes se enviaron con una forma diseñada especialmente para tal efecto (anexo III), al laboratorio de análisis clínico del I.N.R. para la extracción de 10 a 12 mL de sangre periférica (anexo IV). Las muestras recolectadas diariamente, se enviaron al laboratorio de genética para la separación del plasma (anexo V), con anticoagulante EDTA para la determinación

de Hcy y citrato de sodio para la determinación de PC, PS y AT. Asimismo se realizó la extracción de DNA (anexo VI).

#### 5.4.2 Obtención del plasma

Las muestras con EDTA y citrato de sodio, se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 minutos, se separó el plasma en alícuotas y se conservó a -70 °C hasta el procesamiento de las muestras.

#### Diagrama de flujo



## **5.5 Determinación de Hcy y las proteínas PC, PS y AT.**

Se realizó la determinación de homocisteína y proteínas de la coagulación: PC, PS y AT utilizando kits comerciales por el método coagulométrico y/o cromogénico mediante los Sistemas de Coagulación IL versión ACL Elite Pro, IL Diagnostic (Instrumentation Laboratory Spa-V.le Monza 338-20128 Milano Italy). A continuación se detalla la metodología para cada prueba.

### **5.5.1 Determinación de homocisteína por inmunoensayo**

Se utilizó el kit comercial (0020007800) para la determinación cuantitativa de L-homocisteína total en plasma en los sistemas de coagulación IL.

El kit de homocisteína consta de: un vial de buffer (solución tampón fosfato), un vial reductor de adenosina y solución de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en tampón fosfato, un vial de enzima de solución S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa recombinante (SAHH) en tampón fosfato, un vial de conjugado de solución de conjugado en PBS (solución tampón fosfato) y un vial de  $\alpha$ -SAH látex de una suspensión liofilizada de partículas de látex de poliestireno sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal anti-S-adenosil-L-homocisteína (SAH) en un tampón con albumina de suero bovino, el cual fue hidratado con 2 mL de agua destilada, se homogenizó suavemente y mantener entre 15 y 25°C durante 30 minutos. Se mezcló suavemente por inversión del vial antes de usarlo. El nivel de homocisteína se mide en 3 etapas: 1) Reducción de la Hcy presente en plasma, como mezcla de formas disulfuradas y ligadas a proteínas, a Hcy libre. 2) Conversión enzimática de la Hcy libre a S-adenosil-L-homocisteína (SAH) por acción de la SAH hidrolasa (SAHH) en presencia de un exceso de adenosina. 3) Reacción de aglutinación competitiva del látex anti-SAH, con el SAH y el conjugado. El grado de aglutinación es inversamente proporcional a la concentración de tHcy en la muestra y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causada por los agregados.

### **5.5.2 Determinación de Proteína C por el método cromogénico**

Se utilizó el kit comercial (0020300500) para la determinación cuantitativa de la Proteína C en plasma citratado para los Sistemas de Coagulación IL.

El kit de Proteína C consta de: un vial diluyente de solución concentrada conteniendo cloruro sódico al 0,9% con conservador, un vial de activador de proteína C de fracción liofilizada derivada del veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix contortrix* (1 unidad/vial), tampón y albúmina de suero bovino con conservador, el cual fue hidratado con 1 mL de agua destilada y un vial de sustrato cromogénico liofilizado hidratado con 2.5 mL de agua destilada, los viales hidratados se homogenizaron suavemente y mantuvieron entre 15 y 25°C durante 30 minutos y mezclaron suavemente por inversión del vial antes de usarlos. Es un ensayo basado en la utilización de un sustrato cromogénico sintético. El nivel de la PC se mide en 2 etapas: 1) incubación del plasma con el activador de la PC y 2) cuantificación de la PC activada usando un sustrato cromogénico sintético. La paranitroanilina liberada se mide cinéticamente a 405 nm, siendo su nivel directamente proporcional al % de activación de la PC en la muestra.

### **5.5.3 Determinación de Proteína S por el método coagulométrico**

Se utilizó el kit comercial (0008468810) para la determinación cuantitativa de la Proteína S funcional en plasma citratado para los Sistemas de Coagulación IL. El kit de Proteína S consta de: un vial de activador de proteína C de fracción proteica liofilizada derivada del veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix contortrix*, el cual fue hidratado con 1.5 mL de agua destilada, un vial de plasma deficiente de proteína S de plasma humano liofilizado al cual se le ha eliminado artificialmente la proteína S, se hidrató con 1 mL de agua destilada, un vial de plasma control de proteína S de plasma humano liofilizado que contiene una concentración baja de proteína S, fue hidratado con 1 mL de agua destilada y un vial de tromboplastina cálcica bovina liofilizada, se hidrató con 1 mL de agua destilada. Los viales una vez hidratados se homogenizaron suavemente, se mantuvieron entre 15 y 25°C durante 30 minutos y mezclaron suavemente por inversión de cada vial antes de usarlos.

El ensayo de la PS determina la actividad funcional de la PS libre, midiendo el grado de propagación del tiempo de protrombina (TP) en presencia del factor tisular, fosfolípidos, iones calcio y PC activada. La actividad de la PS es

proporcional a la prolongación del tiempo de coagulación del plasma deficiente de PS al cual se ha añadido muestra del paciente diluida.

#### **5.5.4. Determinación de Antitrombina por el método cromogénico**

Se utilizó el kit cromogénico (0020008900) para la determinación de antitrombina en plasma en los sistemas de coagulación IL.

El kit de antitrombina consta de: un vial de substrato cromogénico liofilizado, que fue hidratado con 2 mL de agua destilada y factor Xa liofilizado, que también se hidrató con 2.5 mL de agua destilada, se homogeneizan suavemente mantienen entre 15 y 25°C durante 30 minutos, se mezclan suavemente por inversión del vial antes de usarlos. Es un ensayo basado en la utilización de un substrato cromogénico sintético y la inactivación del FXa. El método es como consecuencia específico y no es alterado por el cofactor II de la heparina. El nivel de AT en plasma se mide en dos etapas; a) incubación del plasma con el reactivo factor Xa en presencia de exceso de heparina y b) cuantificación de la actividad del factor Xa residual con un substrato cromogénico sintético. La paranitroanilina liberada se mide cinéticamente a 405 nm siendo su nivel inversamente proporcional al% de actividad de la AT de la muestra.

#### **5.6 Extracción de DNA**

A 2 mL de sangre total se le agregó un volumen de solución de lisis, se agitó ligeramente y centrifugó (3000 rpm, 8min a 4°C), se desechó el sobrenadante; este procedimiento se realizó hasta obtener un botón blanco al cual se le agregó 1 mL de reactivo TriPure. El contenido del tubo fue transferido a un tubo Eppendorf, centrifugado a 12000 rpm 10min a 4°C, se le agregó 200 µL de CHCl<sub>3</sub>, y se dejó incubar 5 min a 4°C. Posteriormente se agitó 15 segundos y se volvió a incubar la muestra durante 10 min. Se centrifugó (12000 rpm 10min a 4°C). Se obtuvieron 3 fases, la primera (transparente) la cual fue desechada. A las fases restantes se les adicionó etanol absoluto (300 µL por cada mL de TriPure utilizado), se homogeneizó e incubó la muestra 4 min a temperatura ambiente, se centrifugó (12000 rpm, 5 min, 4°C), se desechó el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de citrato

de sodio 0.1 M en etanol al 10 % e incubó durante 30 min a temperatura ambiente agitando esporádicamente, se centrifugó (2000 rpm, 5 min, 4 °C) y desechó el sobrenadante; se lavó el botón con 1.5 mL de etanol al 80 %. Se Incubó la muestra 20 min a temperatura ambiente con agitación esporádica, se centrifugó (2000 rpm, 5min, 4°C) y se desechó el sobrenadante, a continuación se dejó secar a temperatura ambiente en campana aproximadamente por 30 min; una vez seco al DNA se le adicionaron de 200 a 250 µL de agua destilada estéril; para disolverlo se colocó en baño metabólico a 60 °C y finalmente se cuantificó y almacenó a -20 °C.

#### Purificación de DNA en Columnas QIAamp

El procedimiento de purificación de ADN QIAamp comprende cuatro pasos y se llevó a cabo utilizando columnas QIAamp de giro en una microcentrífuga estándar o en un tubo al vacío. Ambos procedimientos de giro y al vacío están diseñados para asegurar que no haya contaminación de muestra a muestra y permitir una manipulación segura de muestras potencialmente infecciosas.

Las columnas QIAamp encajan en la mayoría de los tubos estándar de microcentrífuga. En el protocolo de giro, debido a la cantidad de filtrado, 2 mL son recolectados en tubos. Son necesarias para apoyar las columnas de giro QIAamp durante la carga y los pasos de lavado. Para el protocolo al vacío, una inyección de vacío es capaz de producir un vacío de -800 a -900 mbar que son requeridos. El DNA eluido se puede recoger en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.

#### **5.7 Análisis estadístico**

Se realizó el análisis estadístico con el programa SPSS. Las variables se analizaron de acuerdo a su distribución gaussiana, media e intervalo de confianza (IC) del 95% o mediana y las percentiles 25 y 75 %. Se realizó la prueba de análisis multivariado para determinar la asociación de las diferentes variables y los diferentes padecimientos de los pacientes. El análisis estadístico se consideró significativo cuando el valor de  $P$  era  $<0.05$ .

### III. RESULTADOS

Se captaron un total de 115 participante (95 pacientes y 20 controles) a los cuales se les informo del estudio y solicitó firmar una carta de consentimiento informado (anexo I). A su vez, a todos ellos se les aplicó un cuestionario para conocer sus características generales, y si presentaban alguna patología en particular (anexo II). Los participantes que presentaron una o diversas patologías fueron considerados como pacientes y aquellos que no presentaron ninguna patología fueron considerados como controles. En la Tabla 3, se indican las características de esta población de estudio así como las principales patologías encontradas en el grupo de pacientes. Se muestra que en el grupo de pacientes (n=95), 32 fueron hombres (34%) y 63 mujeres (66%). En el grupo control (n=20), 7 fueron hombres (35%) y 13 mujeres (65%). El género femenino predominó en ambos grupos. Dentro de las principales patologías se observó la insuficiencia venosa periférica, hipertensión arterial y la dislipidemia (Tabla 4).

**TABLA 3. Características generales de la población estudiada**

	<b><i>Pacientes</i></b>	<b><i>Controles</i></b>
<b>n</b>	95	20
<b>Rango de edad</b>	50 – 98	50 – 89
<b>Promedio</b>	68.9	60.6
<b>Género</b>		
<b>Mujer</b>	63 (66%)	13 (65%)
<b>Hombre</b>	32 (34%)	7 (35%)

<b>TABLA 4. Patologías en el grupo de pacientes</b>	
<b>PATOLOGÍAS</b>	<b>Num de pacientes</b>
<b>Insuficiencia venosa periférica (IVP)</b>	67
<b>Presión alta (HTA)</b>	58
<b>Dislipidemias</b>	40
<b>Fracturas</b>	36
<b>Diabetes</b>	22
<b>Osteoporosis</b>	15
<b>Enfermedad vascular cerebral (EVC)</b>	14
<b>Cáncer</b>	7
<b>Insuficiencia renal crónica (IRC)</b>	7

Los pacientes se dividieron en grupos de edad (por décadas), distribuidos como se muestra en la Tabla 5. El primer grupo comprendió de 50 a 59 años, el segundo de 60 a 69 años, el tercero de 70 a 79 años y el último grupo comprendió de 80 años en adelante. Se muestra en cada grupo, el número de pacientes y el promedio de edad, la edad máxima fue 98 años.

<b>TABLA 5. Distribución de la población estudiada por grupo de edad</b>	
<b>RANGOS DE EDAD (DÉCADA)</b>	<b>NÚMERO (PROMEDIO)</b>
<b>50 – 59</b>	28 (54.6)
<b>60 – 69</b>	20 (64.4)
<b>70 – 79</b>	19 (76.3)
<b>80 – 89</b>	28 (84.5)

Los participantes también se clasificaron de acuerdo al género en los mismos grupos de edad, como se muestra en la Tabla 6, donde se presenta el promedio de edad para cada grupo.

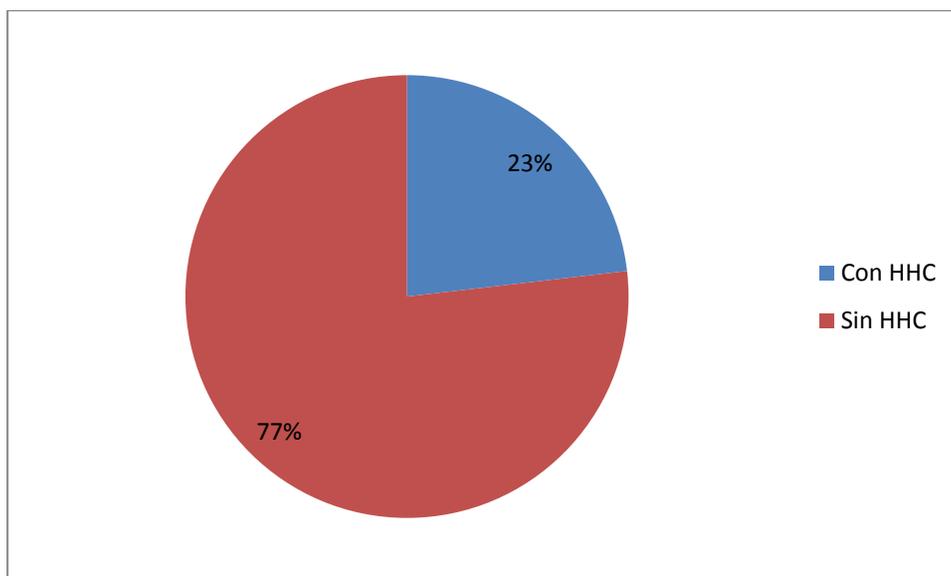
TABLA 6. Distribución de la población por grupo de edad y género				
RANGOS DE EDAD (DÉCADA)	Masculino		Femenino	
	Número	(promedio de edad)	Número	(Promedio de edad)
50 – 59	13	(55.6)	15	(54.2)
60 – 69	7	(62.7)	13	(65.4)
70 – 79	5	(76.2)	14	(76.3)
80 – 89	7	(84.6)	21	(83.6)

A ambos grupos de estudio (pacientes y controles) se les determinaron: la concentración de tHcy en sangre y porcentaje de actividad de la PC, PS y AT.

Los resultados obtenidos de las determinaciones fueron analizados por la prueba de Kolmogorov-smirnov, para conocer si los valores obtenidos seguían una distribución normal (Tabla 7). La PC y AT siguieron una distribución normal, mientras que la PS y la Hcy no presentaron este patrón.

TABLA 7. Análisis de la distribución de variables por la prueba de kolmogorov-smirnov	
VARIABLE ANALIZADA	P DE DOS COLAS
PC	0.121
PS	0.011
AT	0.200
Hcy	0.001

La Figura 6 muestra los niveles de Hcy obtenidos en los pacientes, 22 presentaron niveles elevados de Hcy. En el grupo control no se observaron niveles elevados de Hcy.



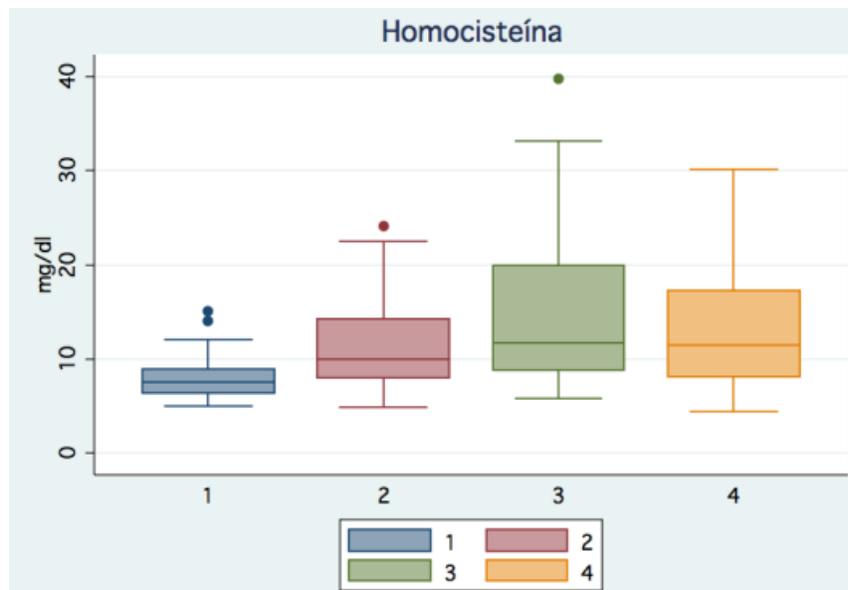
**FIGURA 6. Niveles de Hcy en los pacientes.**

La Tabla 8 muestra los valores de Hcy de acuerdo a la edad; se observa un incremento con la edad hasta los 79 años y después tiende a disminuir. Sólo en las mujeres se observa este patrón. Al realizar el análisis estadístico se obtuvieron diferencias significativas por género y edad.

**TABLA 8. Distribución de los valores de Hcy de la población estudiada de acuerdo al género y edad**

PRUEBA Y GÉNERO	DÉCADA 50 – 59	DÉCADA 60 – 69	DÉCADA 70 – 79	DÉCADA >80	P*
HCY HOMBRES	7.941 6.5-9.4	12.5 10-14.3	9 6.8-10.2	11.6 7.6-17.3	0.0472
HCY MUJERES	7.584 6-8.8	9.514 7.5-20.7	15.4 10.4-20.7	11.4 8.4-19.2	
TOTAL	7.584 6.4 – 9.2	9.948 8.1 – 18.1	10.5 9.2 – 19.9	9.175 8.3 – 17.5	0.0005

\*Análisis multivariado; comparación hombres y mujeres y décadas. La concentración de Hcy se expresa en  $\mu\text{mol/L}$ . Los valores para Hcy se expresan como mediana y percentiles del 25 y 75 %.



**FIGURA 7. Niveles de Hcy en la población estudiada de acuerdo a los grupos de edad**

Para conocer si el porcentaje de actividad de PC, PS y AT variaba de acuerdo al género, la población se dividió como se muestra en la Tabla 9, se determinaron las medias o mediana y el intervalo de confianza para los valores de la PC, PS y AT. En la tabla se muestra que hubo diferencia significativa para los valores de PC, lo que indica que se deben de establecer valores específicos por cada género para PC.

**TABLA 9. Distribución de los valores PC, PS, y AT de la población estudiada de acuerdo al género**

PRUEBA	Media o mediana / Intervalo de confianza o percentiles		P*
	HOMBRES	MUJERES	
<b>PC</b>	103.9	115.4	0.0319
<b>Media</b>	98.3 – 109.6	109.8 – 120.9	
<b>PS</b>	114	121	0.3231
<b>Mediana</b>	100.25 – 127.8	107 – 139	
<b>AT</b>	99.5	103.7	0.1834
<b>Media</b>	94.9 – 104	100.7 – 106.8	

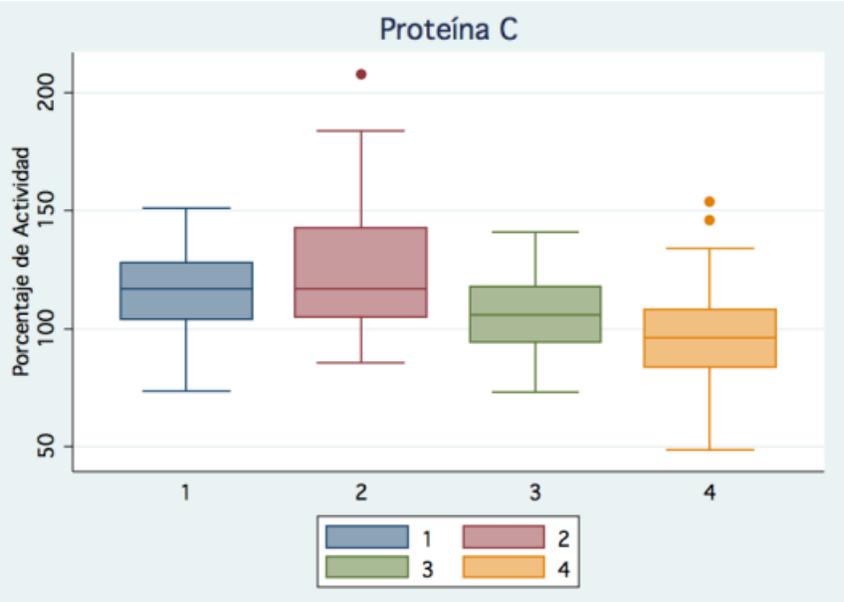
\*Análisis multivariado; comparación hombres y mujeres. Los valores de PC, PS y AT son expresados en porcentaje de actividad. Para la PS los valores se expresan como mediana y percentiles del 25 y 75 %. Para la AT y PC los valores se expresan como media e intervalo de confianza al 90%.

La población se distribuyó por grupos de edad en décadas, para conocer si el porcentaje de actividad de PC, PS y AT variaban de acuerdo a la edad. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10, donde se muestra que hubo diferencia significativa para los valores de PC y PS, lo que indica que se deben tener valores específicos para cada grupo de edad para PC y PS. En esta tabla además, se muestra que la actividad de la PC aumenta con la edad hasta los 69 años y posteriormente disminuye. Para la PS también se observa que se incrementa su actividad conforme avanza la edad hasta 79 años y posteriormente disminuye, y para la AT, se mantiene sin cambio en los diferentes grupos de edad.

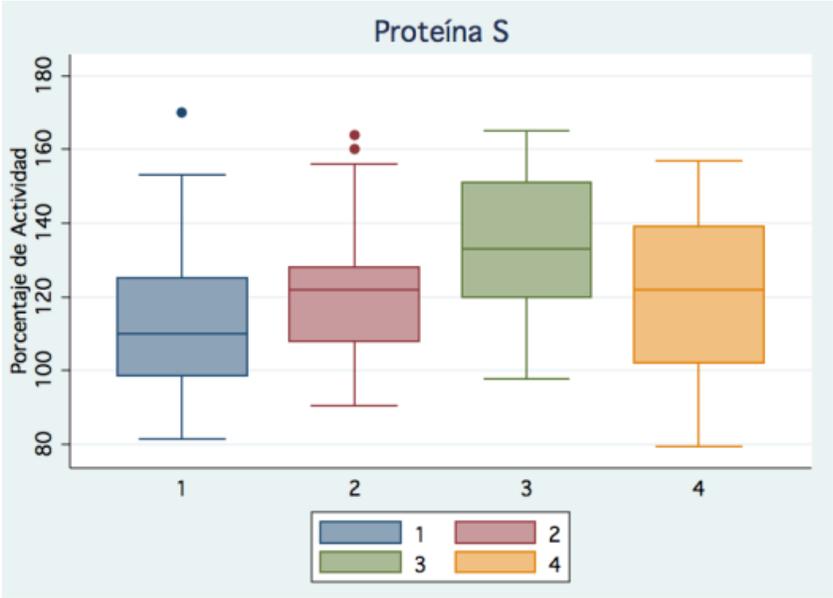
**TABLA 10. Distribución de los valores de PC, PS y AT en la población estudiada de acuerdo a la edad.**

TIPO DE PRUEBA	EDAD EN DÉCADAS				P*
	50 – 59	60 – 69	70 – 79	>80	
<b>PC</b>	116.6 110.8 – 122.5	127.9 116 – 139.9	106 99.1 – 112.9	98.4 91.3 – 105.5	0.0001
<b>PS</b>	110 98.4- 124.8	122 109 – 128.8	134 120 – 154	122 101.3 – 139	0.0024
<b>AT</b>	100.7 97.9 – 103.5	100.6 94.9 – 106.3	108 100.2 – 115.9	101.2 96.3 – 106.1	0.3032

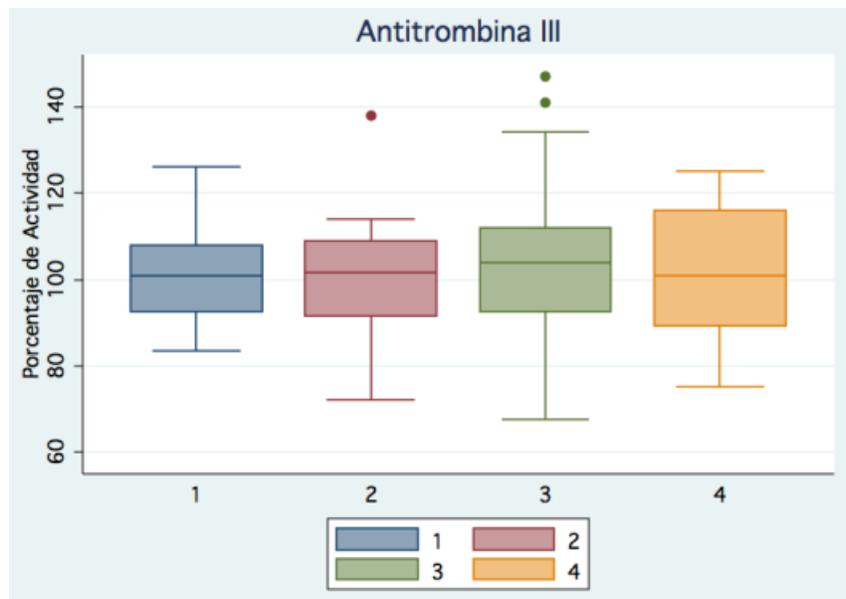
\*Análisis multivariado. Los valores de PC, PS y AT son expresados en porcentaje de actividad. Para la PS los valores se expresan como mediana y percentiles del 25 y 75 %. Para la AT y PC los valores se expresan como media e intervalo de confianza al 90%.



**FIGURA 8. Porcentaje de actividad de la PC en los grupos de edad**



**FIGURA 9. Porcentaje de actividad de la PS en los grupos de edad**



**FIGURA 10. Porcentaje de actividad de la AT en los grupos de edad**

En la Tabla 11 se resumen los resultados obtenidos de los valores para PC, PS y AT por género y grupos de edad. En esta tabla se muestra que para la PC hay diferencia significativa entre grupos de edad y género ( $P= 0.0001$  y  $0.0319$  respectivamente) por lo que se deben establecer valores específicos por cada género y grupo de edad. Para la PS se deben establecer valores específicos por cada grupo de edad pero no por género ( $P= 0.0024$  y  $0.3231$  respectivamente), mientras que para la AT los valores no se modifican ni por género ni por grupos de edad ( $P=0.1834$  y  $0.3032$  respectivamente).

**TABLA 11. Distribución de los valores obtenidos de la PC, PS y AT por edad y género.**

PRUEBA Y GÉNERO	DÉCADA 50 – 59	DÉCADA 60 – 69	DÉCADA 70 – 79	DÉCADA >80	P*
<b>PC HOMBRES</b>	111.6 101.4 – 121.8	106.2 94.4 – 118.5	91.7 80.9 – 102.5	96.2 83.6 – 108.9	0.0319
<b>PC MUJERES</b>	121 114.2 – 127.9	139.6 124.4 – 154.9	111.1 103.4 – 118.9	99.1 90.2 – 108.1	
<b>TOTAL</b>	116.6 110.8 – 122.5	127.9 116 – 139.9	106 99.1 – 112.9	98.4 91.3 – 105.5	0.0001
<b>PS HOMBRES</b>	100.5 97.9-118	123 105 -127	134 127-158	120 96-124	0.3231
<b>PS MUJERES</b>	112 103-125	123 110-142.5	132 111.8-154.2	123 104.5-139.5	
<b>TOTAL</b>	110 98.4- 124.8	122 109 – 128.8	134 120 – 154	122 101.3 – 139	0.0024
<b>AT HOMBRES</b>	101.1 96.3 – 105.9	85.9 78.9 – 92.9	121.2 106.3 – 136.1	94.4 87.5 – 101.4	0.1834
<b>AT MUJERES</b>	100.4 96.6 – 104.1	108.5 103.3 – 113.7	103.3 94.2 -112.5	103.4 97.3 – 109.5	
<b>TOTAL</b>	100.7 97.9 – 103.5	100.6 94.9 – 106.3	108 100.2 – 115.9	101.2 96.3 – 106.1	0.3032

\*Análisis multivariado. Los valores de PC, PS y AT son expresados en porcentaje de actividad. Para la PS los valores se expresan como mediana y percentiles del 25 y 75 %. Para la AT y PC los valores se expresan como media e intervalo de confianza al 90%.

En la Tabla 12, se muestran las correlaciones entre cada par de variables, en el cual se incluyeron todos los pacientes sin importar género y edad. Se puede observar, que existe una correlación entre la PC y la PS, lo que nos indica que el porcentaje de actividad en ambas proteínas no correlaciona, mientras que la comparación del porcentaje de actividad entre la PC con la AT y la concentración de Hcy, el comportamiento fue semejante, no habiendo correlación entre ellas. Para el caso de la actividad de la PS comparada con la actividad de la AT y concentración de Hcy hubo correlación, es decir el comportamiento de las

concentraciones y porcentaje de actividad fue diferente. Se observó que no hubo correlación entre la AT comparada con la concentración de Hcy.

**TABLA 12. Correlaciones entre las variables**

Variable	<i>P</i> *
PC – PS	0.0031
PC – AT	0.0712
PC – Hcy	0.7562
PS – AT	0.0001
PS – Hcy	0.0349
AT-Hcy	0.4747

\*Correlación de Pearson

En la Tabla 13 se muestra la correlación entre las variables: Hcy, PC, PS, AT y padecimientos de los adultos mayores. En esta tabla únicamente se muestran aquellas en las que hubo correlación.

**TABLA 13. Asociación entre variables determinadas y padecimientos de los adultos mayores.**

Padecimiento	Variable asociada	<i>P</i> *
<b>Hipertensión arterial</b>	AT	0.03
	Hcy	0.004
<b>Insuficiencia renal crónica</b>	PC	0.007
	Hcy	0.049
<b>Dislipidemia</b>	PC	0.025
<b>Evento vascular cerebral</b>	PC	0.013

En esta tabla podemos observar que en la HTA, el porcentaje de actividad de AT y la concentración de Hcy es diferente con respecto a las otras patologías. En la insuficiencia renal crónica el porcentaje de actividad de PC y la concentración Hcy de igual manera es diferente con respecto a las otras patologías. En las

dislipidemias como en el EVC el porcentaje de actividad de la PC fue diferente con respecto a las otras patologías.

Al realizar la prueba de riesgo relativo (razón de momios), se observó que ningún padecimiento tuvo relación con los resultados obtenidos de las variables estudiadas, es decir no se modifica el % de actividad de las proteínas antitrombóticas y la concentración de Hcy. El rango de los valores de riesgo estuvo entre 0.01 y 1.15.

Finalmente, se realizó la comparación de la actividad de la PC, PS, AT y la concentración de Hcy entre el grupo considerado como control y los pacientes con las patologías antes descritas, los resultados se muestran en la Tabla 14. Para las proteínas PC, PS y AT no se observó diferencia significativa, en tanto que para la Hcy si hubo diferencia significativa entre los pacientes y el grupo control. Lo que nos indica que las patologías encontradas en los pacientes se relacionan por la concentración de Hcy.

TABLA 14. Comparación entre grupo control y pacientes			
PRUEBA	GRUPO CONTROL	PACIENTES	P
AT	100.23	102.29	0.2792*
PC	114.74	111.51	0.2880*
PS	114	120	0.2780**
Hcy	7.625	8.674	0.0222**

\*T de student. \*\* U de Mann- Whitney

#### IV. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo realizado en adultos mayores de la Ciudad de México para determinar los niveles de Hcy, PC, PS y AT en individuos con patologías que podrían estar asociadas a la edad, que acudieron a los servicios médicos por traumatismos ajenos a patologías específicas.

Como ha sido descrito, la enfermedad cerebro vascular, Alzheimer, insuficiencia renal crónica, demencia, insuficiencia venosa periférica, Parkinson, diabetes, hipertensión, aterosclerosis y dislipidemias se han asociado con alteración en los niveles de Hcy y/o las proteínas antitrombóticas<sup>50-59</sup>, sin embargo, no se tienen reportes de cómo se encuentran los niveles de estos marcadores en adultos mayores con estas patologías, más aún sabemos que patologías como estas pueden estar involucradas en el proceso de envejecimiento. En la población estudiada las principales patologías que encontramos fueron IVP, HTA y dislipidemias, entre otras, como se ha descrito en otras poblaciones. Además sabemos que dichos padecimientos se han asociado a HHC en jóvenes y adultos por mecanismos de tipo adquirido o hereditario<sup>2, 25, 36</sup>. Es por ello, que en este trabajo determinamos la distribución de los valores de Hcy de los pacientes de acuerdo al género y edad, encontrando diferencias significativas, lo que indica que se deben tener valores específicos por género y grupo de edad.

En nuestra población total, el 24% tuvo aumento en los niveles de Hcy, hecho que podría estar relacionado con el daño endotelial que genera la Hcy al oxidarse, dado que existen evidencias experimentales de que la Hcy al oxidarse genera radicales libres con un efecto citotóxico sobre las células endoteliales<sup>15</sup>, bloqueando los mecanismos anticoagulantes mediados por la PC, PS, AT<sup>37</sup> y factores de coagulación<sup>44,47</sup>. En este trabajo las proteínas antitrombóticas (PC, PS y AT) no se encontraron disminuidas en su actividad, sin embargo, la actividad de la PS se vio afectada en un individuo, que al correlacionar los valores de esta proteína con la Hcy, dio un resultado estadísticamente significativo.

El proceso de envejecimiento se acompaña de una serie de cambios fisiológicos que alteran la capacidad física del individuo y también los hábitos y conductas alimentarias del adulto mayor <sup>40,43</sup>; por esta razón, este tipo de población es vulnerable a los estados de mal nutrición y deficiencias específicas de nutrientes como la vitamina B12, B6 y ácido fólico entre otros; aproximadamente, dos tercios de los pacientes que presentan HHC están asociados con niveles bajos de vitamina B12, B6 y ácido fólico <sup>41</sup>, los cuales juegan un papel importante en el metabolismo de este aminoácido, por esta razón se ve incrementada en este grupo de edad <sup>42</sup>. Nuestros resultados indican que el 24% de la población estudiada presentó HHC; este dato no ha sido descrito en este tipo de población en México, y aunque el tamaño de muestra en este trabajo no es significativo para representar a la población mexicana de este rango de edad, si proporciona una primera evidencia de que esta población podría tener HHC por lo menos en aproximadamente un 24%, este porcentaje podría ser incluso mayor debido a deficiencias nutricionales, malos hábitos alimenticios y alteraciones metabólicas.

En México, no se han establecido valores de referencia para Hcy lo cual sería trascendental para este tipo de población debido a que se considera un factor de riesgo cardiovascular. Al realizar la distribución de los valores de referencia de Hcy en nuestro país, se podrían confrontar con los valores de referencia obtenidos en otros países con los de nuestra población, debido a que la alimentación, información genética, estilo de vida, etc., difieren con los países europeos y de Norteamérica de donde se han obtenido estos valores <sup>17, 19, 22</sup>.

En los adultos mayores la inmovilidad deteriora de manera significativa la calidad de vida, las principales causas son: falta de fuerza o debilidad, rigidez, dolor, alteraciones del equilibrio y problemas psicológicos, lo cual conlleva a una disminución de la capacidad motriz del adulto mayor <sup>40,41</sup>. La trombosis venosa es una enfermedad común en los adultos mayores que deriva de la inmovilidad y que puede agravarse debido a déficit de proteína C y S, déficit de antitrombina III, etc.

En la PC observamos una tendencia a incrementar su actividad en los primeros 2 grupos de edad que comprenden las edades de 50 hasta 69 años, en los últimos 2 grupos de edad de 70 años en adelante, disminuye su actividad conforme avanza la edad, siendo un factor de riesgo elevado para eventos trombóticos, también encontramos una diferencia entre hombres y mujeres en el porcentaje de actividad, debido a que las mujeres que consumen anticonceptivos orales o se encuentran embarazadas tienen un riesgo relevante de trombosis.

Para la PS (cofactor de la PC en la inhibición de la coagulación) observamos una tendencia a incrementar su actividad conforme avanza la edad de 50 hasta 79 años, no así para la edad de 80 años en adelante, en donde se ve disminución de la actividad de la PS, considerada también un factor de riesgo para trombosis en adultos mayores. Su actividad de acuerdo al género no varió en la población estudiada, sin embargo, si hubo diferencia con la edad.

La actividad de antitrombina no se modificó en los 4 grupos de edad, una ligera tendencia a incrementar conforme avanza la edad, pero no fue estadísticamente significativo por lo cual su actividad no se modifica en los grupos de edad y tampoco de acuerdo al sexo; un estudio realizado en 2007 por Middeldorp y colaboradores, informaron que en población general que donó sangre, la prevalencia de deficiencia de antitrombina es de 1:300<sup>83</sup>.

Para correlacionar los niveles de homocisteína con el porcentaje de actividad de las proteínas antitrombóticas (PC, PS y AT), se usó la prueba de Correlación de Pearson entre cada par de variable, obtuvimos correlación significativa entre las variables PC – PS, PS - AT y PS – Hcy, lo que nos indica que el comportamiento de su actividad en ambas proteínas es diferente, mientras que la comparación de las concentraciones y porcentajes de actividad entre la PC – AT, PC – Hcy y AT – Hcy, el comportamiento fue semejante, no habiendo correlación entre ellas, lo que nos indica que su concentración y porcentajes de actividad entre ambas determinaciones fue semejante.

Las deficiencias de los inhibidores naturales de la coagulación son raras; deficiencias de PC, PS y AT estas se detectan en menos del 1% de la población en general y en menos del 10% de los pacientes con trombosis venosa. En nuestros resultados no se observó disminución del porcentaje de actividad de las proteínas antitrombóticas.

También, se realizó la correlación entre las variables determinadas: PC, PS, AT y Hcy y los padecimientos de los adultos mayores, hubo correlación en la hipertensión arterial (HTA) con AT y Hcy, el mecanismo que relaciona la homocisteína con las enfermedades cardiovasculares puede ser la inducción de lesiones vasculares, aunque este mecanismo exacto todavía no se conoce completamente. La homocisteína puede producir descamación de las células endoteliales, oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, reducción de la respuesta vascular o aumento de la adhesión de los monocitos. En 1997 Sutton-Tyrrell, publicó que las concentraciones elevadas de homocisteína pueden relacionarse habitualmente con la hipertensión, dicha interacción puede promover la trombogénesis y la aterogénesis, originando la disminución de la AT y episodios cardiovasculares<sup>49, 78</sup>.

En la insuficiencia renal crónica la concentración de Hcy y PC de igual manera es diferente. Los niveles plasmáticos de Hcy se elevan de 2 a 4 veces en este tipo de pacientes, aún no está claro si la hiperhomocisteinemia de los pacientes en estados finales se debe a reducción de la excreción o a la alteración del metabolismo del aminoácido en las células renales. Con relación a la PC se ha descrito que en la IRC hay pérdida de esta proteína a través de la excreción renal, por lo tanto hay disminución de su concentración, lo que provocaría la tendencia a la formación de trombos a nivel de piel, ojos, cerebro y riñones<sup>37,70</sup>.

En las dislipidemias como en la EVC la actividad de la PC fue diferente. Se conoce que las dislipidemias están asociadas con la enfermedad aterosclerótica y son factores de riesgo importante de la tendencia trombótica. En 1993, Tanner y col., demostraron que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas reducen la

producción de ON e incrementan la endotelina-1 y que estas mismas alteraciones de la función endotelial ocurren en la hipercolesterolemia. Estos trastornos de la función endotelial contribuyen notablemente a la existencia de un estado de hipercoagulabilidad, disminuyendo la funcionalidad de la PC.

La EVC, se clasifica en oclusiva y hemorrágica, la oclusiva pueden ser de tipo trombótico en donde, el flujo de sangre de una arteria cerebral se bloquea debido a un coágulo que se forma dentro de la arteria. La aterosclerosis, que es la acumulación de depósitos grasos en las paredes de las arterias, causa un estrechamiento de los vasos sanguíneos y con frecuencia es responsable de la formación de dichos coágulos. Y de tipo embólico, en donde el coágulo se origina en alguna parte alejada del cerebro, por ejemplo en el corazón. Una porción del coágulo (émbolo) se desprende y es arrastrado por la corriente sanguínea al cerebro, el coágulo llega a un punto que es lo suficientemente estrecho como para no poder continuar y tapa el vaso sanguíneo, cortando el abastecimiento de sangre<sup>52,53</sup>. En general la enfermedad vascular cerebral (EVC) constituye una de las principales causas de muerte y la principal causa de incapacidad en sujetos mayores de 60 años. En México constituye la 5a causa de muerte. Los factores de riesgo relevantes para la EVC son resistencia a la proteína C, deficiencia de proteína C, deficiencia S, deficiencia de AT, factor V de Leiden, etc<sup>74,75</sup>.

Finalmente, al realizar la prueba de riesgo relativo, se observó que ningún padecimiento influenció significativamente los resultados obtenidos de las variables estudiadas, los rangos de los valores de riesgo estuvieron entre 0.01 y 1.15. Sin embargo se obtuvieron valores de riesgo relativo PC (0.0101785) y para la PS (0.0121511) con relación a HTA, lo cual sugiere que en esta población de estudio, PC y PS podrían ser factores que protegen el desarrollo de esta enfermedad a la población de adultos mayores.

Es por ello que es necesario realizar un mayor número de determinaciones de estos marcadores con el fin de establecer el valor de referencia para la población mexicana y con ello, los factores de riesgo que pudieran estar implicados en las diferentes patologías que aquejan particularmente a los adultos mayores.

## V. CONCLUSIONES

- Los niveles de homocisteína altos en sangre periférica afectan significativamente la actividad de la PS en adultos de 50 años o más, no así a la PC y AT.
- Se obtuvo asociación significativa entre la hipertensión con la concentración de Homocisteína y la actividad de antitrombina.
- La insuficiencia renal crónica se asoció con la concentración de homocisteína y actividad de proteína C. Así mismo el evento vascular cerebral y las dislipidemias con la actividad de la proteína C.

## VI. REFERENCIAS

1. Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS
2. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood*. 1997;90:1-11.
3. Sepúlveda-Sánchez JM, Matía-Francés R, Martínez-Salio A, González-de la Aleja-Tejera J, Rodríguez-Peña Marín M, Porta-Etessam J. Homocysteine and cerebrovascular disease. *Rev Neurol* 2004;38:347-358.
4. Zavala Hernández C, Isordia Salas I, Martínez Murillo C, Reyes Maldonado E. Hiperhomocistinemia una causa poco conocida de trombosis en México. *Rev Hemo Trombo* 2007;1:40-45.
5. Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism* 1996;45:133-5.
6. Booth GL, Wang EE. Preventive health care, 2000 update: screening and management of hyperhomocysteinemia for the prevention of coronary artery disease events. The Canadian Task Force on Preventive Health Care. *CMAJ* 2000;163:21-9.
7. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-128.
8. Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Selhub J, Bowman BA, Gunter EW, Wright JD, Johnson CL. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr*. 1999;69:482-489.
9. Stehouwer CD, Fischer HR, van Kuijk AW, Polak BC, Donker AJ. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes*. 1995;44:561-564.
10. Lindgren A, Brattstrom L, Norrving B, Hultberg B, Andersson A, Johansson BB. Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. *Stroke* 1995;26:795-800.

11. Kim MK, Ordovas J, Selhub J Campos H. B vitamins and plasma homocysteine concentrations in an urban and rural area of Costa Rica. *J Am Coll Nutr* 2003;22:224-231.
12. Allen LH, Rosado JL, Casterline JE, Martinez H, Lopez P, Muñoz E, Black AK. Vitamin B-12 deficiency and malabsorption are highly prevalent in rural Mexican communities. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1013-1019. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1013-1019.
13. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 1999;19:217-246.
14. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B vitamins, and coronary artery disease. *Med Clin North Am* 2000;84:215-237.
15. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998;338:1042-50.
16. Rivara ML, Di-Genaro G, González-Romero DJ. Homocisteina y enfermedad vascular oclusiva. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina* 2006;154:24-31.
17. Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvåle G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995;274:1526-1533.
18. Cravo ML, Glória LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, Cardoso JN, Leitão CN, Mira FC. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr* 1996;63:220-224.
19. Nygård O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE, Kvåle G, Vollset SE. Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 1997;65:136-143.
20. Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:17-32.
21. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr*. 1998;157 Suppl 2:S40-44.
22. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998;44(8 Pt 2):1833-1843.

23. Moghadasian MH, McManus BM, Frohlich JJ. Homocyst(e)ine and coronary artery disease. Clinical evidence and genetic and metabolic background. *Arch Intern Med* 1997;157:2299-2308.
24. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* 1996;5:1851-1858.
25. Miner SE, Evrovski J, Cole DE. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997;30(3):189-201.
26. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* 1984;259:9508-13.
27. Dudman NP, Guo XW, Gordon RB, Dawson PA, Wilcken DE. Human homocysteine catabolism: three major pathways and their relevance to development of arterial occlusive disease. *J Nutr* 1996;126(4 Suppl):1295S-1300S.
28. Matadamas Z, Pérez C, Hernández J, Majluf C. Nuevos factores de riesgo cardiovascular: hiperhomocisteinemia. *Rev Med IMSS* 2003;4:235-249.
29. Guba SC, Fink LM, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia. An emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. *Am J Clin Pathol* 1996;106:709-722.
30. Carey MC, Donovan DE, FitzGerald O, McAuley FD. Homocystinuria. I. A clinical and pathological study of nine subjects in six families. *Am J Med* 1968;45:7-25.
31. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999;354:407-413.
32. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1258-1260.
33. Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, Rickards O, De Stefano GF, Prisco D, Gensini GF, Abbate R. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1998; 63:917-920.

34. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-421.
35. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693-2698.
36. Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Witteman J, Graham I. Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 1998;97:437-43.
37. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993;91:308-318.
38. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homo Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:517-527.
39. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 1991;51:828-835.
40. Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000;71:614S-620S.
41. Falque-Madrid L, Piñero-Corredor MP, Zambrano de Rodriguez N, Quintero J, Souki de Gabarrón A, Arias-Marquez N. Nutritional status and body composition of a group of non-institutionalized elderly in the State of Zulia, Venezuela. *Arch Latinoam Nutr* 1996;46:190-5.
42. Ubbink JB. Homocysteine an atherogenic and a thrombogenic factor? *Nutr Rev* 1995;53:323-325.
43. Houston DK, Johnson MA, Nozza RJ, Gunter EW, Shea KJ, Cutler GM, Edmonds JT. Age-related hearing loss, vitamin B-12, and folate in elderly women. *Am J Clin Nutr* 1999;69:564-571.

44. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 1998;25:385-391.
45. Hajjar KA. Homocysteine: a sulph'rous fire. *J Clin Invest* 2001;107(6):663-4.
46. Glueck CJ, Shaw P, Lang JE, Tracy T, Sieve-Smith L, Wang Y. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol* 1995;75:132-136.
47. Domagała TB, Undas A, Libura M, Szczeklik A. Pathogenesis of vascular disease in hyperhomocysteinaemia. *J Cardiovasc Risk* 1998;5:239-247.
48. Krumdieck CL, Prince CW. Mechanisms of homocysteine toxicity on connective tissues: implications for the morbidity of aging. *J Nutr* 2000;130(2S Suppl):365S-368S.
49. [www..medilegis.com/bancoconocimiento/t/tribuna101n6iatero\\_p10-18/artero2.htm](http://www.medilegis.com/bancoconocimiento/t/tribuna101n6iatero_p10-18/artero2.htm)
50. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131:363-375.
51. Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2074-2081.
52. McCarty MF. Insulin secretion as a potential determinant of homocysteine levels. *Med Hypotheses* 2000;55:454-5.
53. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Beks PJ, Mackaay AJ, Jakobs C, Bouter LM, Heine RJ, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:133-138.
54. Stehouwer CD, Fischer HR, van Kuijk AW, Polak BC, Donker AJ. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes* 1995;44:561-4.
55. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-483.

56. García VA, Custodio N, Montesinos R. Apoptosis y caspasas en enfermedad de Alzheimer. *Rev Per Neurol* 2000;6:24-29.
57. Loscalzo J. Homocysteine and dementias. *N Engl J Med* 2002;346:466-468.
58. Martínez LE, Martínez HR, Del Roble VM, Sampallo E, Aguirre RA, González HC, Cantú LA, Garza NL, Rivas MA Niveles séricos de homocisteína en enfermedad de Parkinson. *Rev Mex Neuroci* 2003; 4:413-418.
59. Rodríguez ML, Serra VI, Álvarez GE. Homocistinemia, factor de riesgo oculto en la enfermedad cerebrovascular isquémica. Presentación de un caso. *Rev Cubana Med* 2003;42.
60. Fernández-Moreno MC, Castilla-Guerra L, Castilla-Murillo A, Cueli-Rincón B, Fernández-Bolaños R, Gutiérrez-Tous R, Jiménez-Hernández MD. Hyperhomocysteinemia-related cerebral venous thrombosis. *Rev Neurol* 2003;37:1040-3.
61. Harpel PC, Chang VT, Borth W. Homocysteine and other sulfhydryl compounds enhance the binding of lipoprotein(a) to fibrin: a potential biochemical link between thrombosis, atherogenesis, and sulfhydryl compound metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:10193-10197.
62. Kahn SR. The clinical diagnosis of deep venous thrombosis: integrating incidence, risk factors, and symptoms and signs. *Arch Intern Med* 1998;158:2315-2323.
63. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359:938-49.
64. YaYacovella T, Alter M. Anticoagulation for venous thromboembolism. What are the current options? *Postgrad Med* 2000;108:43-46,51-54.
65. Delahousse B, lochmann S, Pouplard C, Fimbel B, Charbonnier B, Gruel Y. Pseudo-homozygous activated protein C resistance due to coinheritance of heterozygous factor V Leiden mutation and type I factor V deficiency. Variable expression when analyzed by different activated protein C resistance functional assays. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997;8:503-509.
66. Miletich JP. Thrombophilia as a multigenic disorder. *Semin Thromb Hemost* 1998;24 Suppl 1:13-20.

67. Esmon CT. Protein S and protein C Biochemistry, physiology, and clinical manifestation of deficiencies. *Trends Cardiovasc Med* 1992;2:214-219.
68. Kraus M. The anticoagulant potential of the protein C system in hereditary and acquired thrombophilia: pathomechanisms and new tools for assessing its clinical relevance. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:337-354.
69. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. *N Engl J Med*. 1986;314:1298-1304.
70. Esmon CT. Inflammation and thrombosis: the impact of inflammation on the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica* 1995;80(2 Suppl):49-56.
71. Martínez M, Quintana G. *Manual de Hemostasia y trombosis*. México. Edit. Prado 1996.
72. Sigler M, Castañeda G, Athié R. *Trombosis venosa profunda y embolia pulmonar*. Primera edición. México, Editorial Mc Graw Hill 2002; p 251-275.
73. Engesser L, Broekmans AW, Briët E, Brommer EJ, Bertina RM. Hereditary protein S deficiency: clinical manifestations. *Ann Intern Med* 1987;106:677-682.
74. Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607-614.
75. Francis JL. Laboratory investigation of hypercoagulability. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:111-26.
76. Faioni EM, Valsecchi C, Palla A, Taioli E, Razzari C, Mannucci PM. Free protein S deficiency is a risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997;78:1343-1346.
77. Gómez E, Ledford MR, Pegelow CH, Reitsma PH, Bertina RM. Homozygous protein S deficiency due to a one base pair deletion that leads to a stop codon in exon III of the protein S gene. *Thromb Haemost* 1994;71:723-726.
78. Seegers WH, Johnson JF, Fell C. An antithrombin reaction to prothrombin activation. *Am J Physiol* 1954;176:97-103.
79. Li W, Johnson DJ, Esmon CT, Huntington JA. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:857-862.
80. Martínez M, Quintana G. *Hemostasia y trombosis*. México. Edit. Prado 2008. Pág 127-143.

81. Johnson DJ, Langdown J, Li W, Luis SA, Baglin TP, Huntington JA. Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation. *J Biol Chem* 2006;281:35478-35486.
82. Wells PS, Blajchman MA, Henderson P, Wells MJ, Demers C, Bourque R, McAvoy A. Prevalence of antithrombin deficiency in healthy blood donors: a cross-sectional study. *Am J Hematol*;45:321-324
84. Tanner FC, Boulanger CM, Cosoher TF. Endothelium-derived nitric oxide, endothelium and platelet vessel wall interaction: alterations in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 1993;19:167-75.
85. Middeldorp S, Levi M. Thrombophilia: An Update. *Sem Thromb Hemost* 2007;23:563-569.
86. Martínez MC. Trombofilia primaria en México: experiencia de una institución *Rev Med Hosp Gen* 2010;73:225-30.

## VII. ANEXOS

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F. a 11 de Abril de 2011.

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento para participar en el estudio: **“Determinación de las principales proteínas reguladoras de la coagulación asociada a los niveles de homocisteína en adultos mayores”** lo cual he aceptado en forma libre y voluntaria.

Previamente, se me ha explicado en forma satisfactoria que la finalidad es determinar los niveles de homocisteína y de las proteínas C, S, y AT que existen en las personas adultas mayores, ya que su elevación es un factor de riesgo para varias enfermedades y por otro lado tiene el objetivo de crear un banco de DNA, necesario para realizar estudios genéticos que nos permitan ayudar a detectar, prevenir y tratar enfermedades crónicas y degenerativas relacionadas a la coagulación, y será empleado única y exclusivamente con el fin mencionado. Para tal efecto, es necesaria la toma de una muestra de sangre de 8 ml por medio de punción venosa a través de la piel (con una jeringa usual), con un riesgo mínimo para mi persona como podría ser la formación de un hematoma (moretón). Tal procedimiento no es necesario para el diagnóstico o el tratamiento de mi padecimiento, pero entiendo que de ésta investigación servirá para el mejor conocimiento de las enfermedades.

Asimismo, se me ha explicado que me es posible solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación, y que estoy en libertad de negarme a participar en el presente estudio.

---

Nombre

---

Firma

---

Nombre Testigo

Firma Testigo

**ANEXO II**

Cedula de captación de datos de los pacientes del proyecto: determinación de homocisteína en adultos mayores de 65 años del servicio de rehabilitación geriátrica del I.N.R.

Teléfono:	Lugar de origen:
Edad (años):	Peso (Kg):
Sexo:	Talla (mts):
	I.M.C. =
No de expediente:	

**DATOS GENERALES**

No.	Patología	Si	No	Tiempo Evoluc.	Padres		Abuelos			
					Padre	Madre	Pateros		Maternos	
							Abuelo	Abuela	Abuelo	Abuela
1	Diabetes mellitus tipo II									
2	Hipertensión Arterial									
3	Osteoporosis									
4	Fracturas									
5	Dislipidemias									
6	Cáncer									
7	Parkinson									
8	Demencia									
9	Afecciones renales primarias									
10	Infarto al miocardio									
11	Insuficiencia venosa periférica									

OTROS	Si	No	No. cigarrillos al día	Tiempo total (años, meses)
Tabaquismo:				

Comentarios:	
Nombre del capturista:	

**ANEXO III**  
**ENVIO DE PACIENTES A LABORATORIO CLINICO**

**Estimado paciente:**

Presentarse para la toma de una muestra de sangre con el Dr. Cesar Zavala Hernández en el Servicio del Laboratorio Central de Análisis Clínicos del Instituto Nacional Rehabilitación, ubicado junto a la fuente central planta baja y a un lado del Banco de Sangre.

## ANEXO IV

### EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE VENOSA

#### Material

- algodón
- jeringas de 10 ml
- agujas de 21x1 mm
- ligadura
- tubos vacutainer estériles sellados al vacío, de 12x75 mm de capacidad conteniendo EDTA tripotásico
- etiquetas

#### **Procedimiento:**

Serán recolectados de 5 a 8 ml de sangre mediante punción venosa con jeringas de 10 ml, y se agregarán en tubos con EDTA; cada tubo deberá ser identificado con los datos necesarios.

## ANEXO V

### OBTENCIÓN DEL PLASMA

#### Material

- Pipetas serológicas
- Microtubos

#### Equipo

- Centrifuga
- Congelador

#### Procedimiento:

Inmediatamente después de obtener las muestras de sangre, las muestras destinadas para la extracción de plasma serán centrifugados 3000 RPM por 15 min a 4 °C. Separar el plasma con una pipeta serológica y transferirlo a un tubo de 1.5 ml para su almacenamiento.

Las muestras de plasma podrán ser almacenadas en congelación a -20 °C hasta su determinación, a fin de mantener la estabilidad de las mismas hasta que sean procesadas.