

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Escuela de Salud Pública de México

Maestría en Salud Pública con área de Concentración en Epidemiología.

Generación 2008-2010.

**DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE ALIENTO CON ^{13}C -METIONINA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
HIPERHOMOCISTEINEMIA EN SUJETOS ADULTOS.**

MALDONADO HERNÁNDEZ JORGE.

México D.F., 9 de Abril de 2010.

Resumen.

Introducción. Se han detectado pacientes con niveles normales de homocisteína en ayuno pero niveles anormales en condiciones postprandiales. Para evidenciarlos se ha propuesto la medición de los niveles de homocisteína plasmática después de suministrar una carga oral de metionina (**COM, 0.1g/kg**). No obstante, se han observado algunas reacciones desfavorables al utilizar este método. La **prueba de aliento con ^{13}C metionina** es un método no-invasivo que podría ser útil para identificar pacientes con hiperhomocisteinemia.

Objetivo: Comparar el enriquecimiento de carbono 13 exhalado en el CO_2 del aliento después de suministrar una dosis oral de ^{13}C -metionina entre un grupo de pacientes con niveles normales de Hcy y un grupo de pacientes con hiperhomocisteinemia diagnosticados por la COM.

Metodología: Se seleccionarán 10 sujetos con niveles normales de homocisteína y 10 sujetos con hiperhomocisteinemia diagnosticados por la COM, de estudios previos realizados en la UIMN. Los pacientes recibirán una dosis oral de 2.5 mg por kg de peso de 1- ^{13}C -metionina y se colectarán muestras de aliento cada 10 minutos durante dos horas en tubos Exetainer. Las muestras de aliento se conservarán a temperatura ambiente y se determinará el enriquecimiento de ^{13}C por espectrometría de masas de relaciones isotópicas. También se colectará una muestra basal de sangre para medir las concentraciones plasmáticas de homocisteína, vitamina B₆, ácido fólico y vitamina B₁₂.

Análisis estadístico: El enriquecimiento de carbono 13 será expresado en unidades **Delta 13 PDB** y en porcentaje acumulado de dosis oxidada a los 60, 90 y 120 minutos. Los datos serán expresados como media $\pm$ desviación estándar. La comparación entre grupos se realizará con una prueba "t" de Student y el grado de correlación entre el % acumulado de dosis y la concentraciones de Hcy poscarga por medio de un análisis de correlación de Pearson.

Comité de Tesis.

Director de Tesis: Dra. Mardia Guadalupe López Alarcón. Jefa de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Tel: 56 27 69 44; marsau2@prodigy.net.mx

Asesor: MC María de Lourdes Barbosa Cortés. Investigador Asociado C. Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Tel: 56 27 69 00, ext. 22483; bcmariade@hotmail.com

Asesor: MSP, MC Juan Rauda Esquivel. Subdirector de Apoyo Académico. Instituto Nacional de Salud Pública. Tel: 54 87 10 16; jrauda@insp.mx

Índice.

Capítulo	Página
1. Introducción.	5
2. Antecedentes.	7
2.1 Metabolismo de la metionina.	7
2.2 Hiperhomocisteinemia.	10
2.3 Fundamento de la prueba de aliento con ¹³ C-metionina.	11
3. Planteamiento del Problema.	13
4. Justificación.	14
5. Objetivos	15
6. Marco Teórico	16
7. Hipótesis	17
8. Metodología	17
9. Plan de Análisis	21
10. Resultados Esperados	22
11. Bibliografía	23
12. ANEXOS	
Carta de consentimiento informado	25

1. Introducción.

El término hiperhomocisteinemia (**Hhcy**) se utiliza para designar el fenómeno clínico que consiste en la elevación de las concentraciones plasmáticas de homocisteína. La Hhcy es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular (ECV) como enfermedad isquémica del corazón, trombosis venosa e infarto [1, 2]. La prevalencia de este trastorno metabólico reportado en Europa durante el 2005 (n=25,489) fue de **11%** en mayores de 20 años. Por otra parte, en un estudio realizado en Buenos Aires en adultos mayores de 65 años el porcentaje de personas con Hhcy fue de **73.1%** en hombres y **66.4%** en mujeres (n=196). Finalmente, la prevalencia reportada en Australia (2004) en mayores de 50 años de edad fue de **20.8** y **13.7** % en hombres y mujeres, respectivamente (n=2,963) [3]. Las principales causas de Hhcy son la presencia de polimorfismos de enzimas clave en el metabolismo de la homocisteína, deficiencias de ácido fólico, vitamina B₆ y vitamina B₁₂, enfermedad renal e hipotiroidismo, consumo de café, alcohol y tabaquismo; se sabe que es más prevalente en el sexo masculino y en mujeres menopáusicas [3].

Como ya se comentó, la Hhcy se ha asociado estrechamente con ECV. En México, la segunda causa de muerte en hombres y mujeres reportadas durante el 2007 fueron las enfermedades isquémicas del corazón con una tasa de 60.5 y 45.7 por cada 100,000 habitantes, respectivamente [4]. La identificación de pacientes con Hhcy podría ser útil para prevenir y desacelerar el desarrollo de estas enfermedades. Se ha observado que algunos pacientes con niveles normales de homocisteína en estado de ayuno (**<15 µmol/L**) responden de manera anormal a una carga oral de 0.1 g de metionina/kg de peso (**COM**). La COM induce un aumento transitorio en las concentraciones de homocisteína (**Hcy**) circulante con un pico máximo a las 8

horas (h) poscarga. De acuerdo con René Van der Griend, este método permite identificar a un 50% de sujetos adicionales que por sus niveles de Hcy en estado ayuno pudieran ser considerados como normales o de bajo de riesgo [5]. La COM es un método útil para el diagnóstico de Hhcy moderada, no obstante, algunos pacientes presentan efectos adversos como mareo y/o náusea, derivado de la ingesta de la carga de metionina. Aunado a ello, se requieren de dos punciones venosas con un intervalo mínimo de 6 horas para realizar la prueba, por lo que resultaría conveniente desarrollar un método de diagnóstico más simple.

La prueba de aliento con ^{13}C -metionina se ha utilizado en estudios previos para determinar la función hepática en pacientes con esteatosis y cirrosis [6-8]. Como lo describió Spahr [6], el marcaje isotópico de la 1- ^{13}C -metionina se conserva hasta el final de la ruta de transulfuración cuando la cistationina es catabolizada a cisteína, ^{13}C - α -cetobutirato y amonio. Después de una reacción de descarboxilación el carbono 13 del ^{13}C - α -cetobutirato se libera como $^{13}\text{CO}_2$ que puede ser recuperado y cuantificado en el aliento. El **carbono 13** es un isotopo estable (**no radioactivo**) ampliamente utilizado en estudios de nutrición y salud. A diferencia de otros métodos, la prueba de aliento no requiere de personal especializado para la toma de muestra, que además puede ser almacenada por más de 90 días a temperatura ambiente. Al ser un método no invasivo, podría ser útil para estudios poblacionales en los que siempre es deseable ofrecer a los pacientes alternativas de diagnóstico más seguras y menos dolorosas. El hecho de no utilizar muestras sanguíneas reduce considerablemente, en términos de seguridad sanitaria, los riesgos de contagio y facilita significativamente el manejo de material peligroso y de desechos biológicos.

2. Antecedentes.

2.1 Metabolismo de la metionina.

La L-metionina $<C_5H_{11}NO_2S>$ es un aminoácido esencial sulfurado soluble en agua cuyo peso molecular es de 149.21 g/mol. La metionina (**Met**) se requiere para la síntesis de proteína tisular, y su principal función metabólica, además de ser precursor de L-cisteína, es la de formar S-adenosilmetionina (**SAM**); un intermediario metabólico altamente reactivo que transfiere un grupo metilo necesario para la síntesis de neurotransmisores, hormonas y ácidos nucleicos [9]. La homocisteína $<C_4H_8NO_2S>$ es un aminoácido que deriva de este primer grupo de reacciones y únicamente difiere de la metionina por la ausencia del grupo metilo ubicado en la posición 4 de la molécula que fue cedido en las reacciones catalizadas por SAM. La homocisteína (**Hcy**) generada en esta vía de transmetilación puede ser remetilada nuevamente para formar metionina a través del sistema coenzima-folato que requiere de la participación de ácido fólico y vitamina B12. Otra vía adicional para la remetilación de la Hcy se encuentra presente en el hígado y el riñón en donde el grupo metilo proveniente de la betaina es transferido por la acción de la betaina-homocisteína metiltransferasa, dependiente de zinc. La Hcy que no es remetilada se cataboliza por la vía de transulfuración. Ésta se condensa con el aminoácido serina para formar cistationina en una reacción catalizada por la cistationina- β -sintasa (CBS). La cistationina deriva en cisteína, α -cetobutirato y amonio por la acción de la cistationina- γ -liasa (CGL). La finalidad de estas reacciones es la de transferir el azufre presente en la Hcy a la serina para sintetizar cisteína. Las dos enzimas que participan en estas reacciones requieren de fosfato de piridoxal (vitamina B₆) como cofactor. Finalmente el α -cetobutirato reacciona con la coenzima A (CoA) en una reacción catalizada por la α -cetoácido deshidrogenasa dependiente de

NAD, para producir propionil-CoA y liberar una molécula de dióxido de carbono (CO_2) y agua [10, 11]. En la Figura 1 se muestra el metabolismo de la Hcy. Un estudio realizado por MacCOSS sobre la cinética química de los aminoácidos sulfurados en adultos sanos y con una ingesta adecuada de proteína, reveló que de la homocisteína formada por la vía de transmetilación el 45% se remetilaba para formar metionina y el 55% se oxidaba por la vía de transulfuración [12]. De manera general podríamos comentar que el metabolismo de la Hcy depende básicamente de tres aspectos fundamentales: la ingesta de metionina en la dieta, los niveles de ácido fólico, vitamina B_{12} y vitamina B_6 y la actividad de las enzimas involucradas en cada una de las vías metabólicas, principalmente de la metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y de la cistationina- β -sintasa (CBS) [13, 14]. Algunos autores sugieren que las características químicas del grupo tiol (R-SH) de la Hcy, es uno de los factores que predisponen al daño en la estructura y la función endotelial lo cual incrementa el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular.

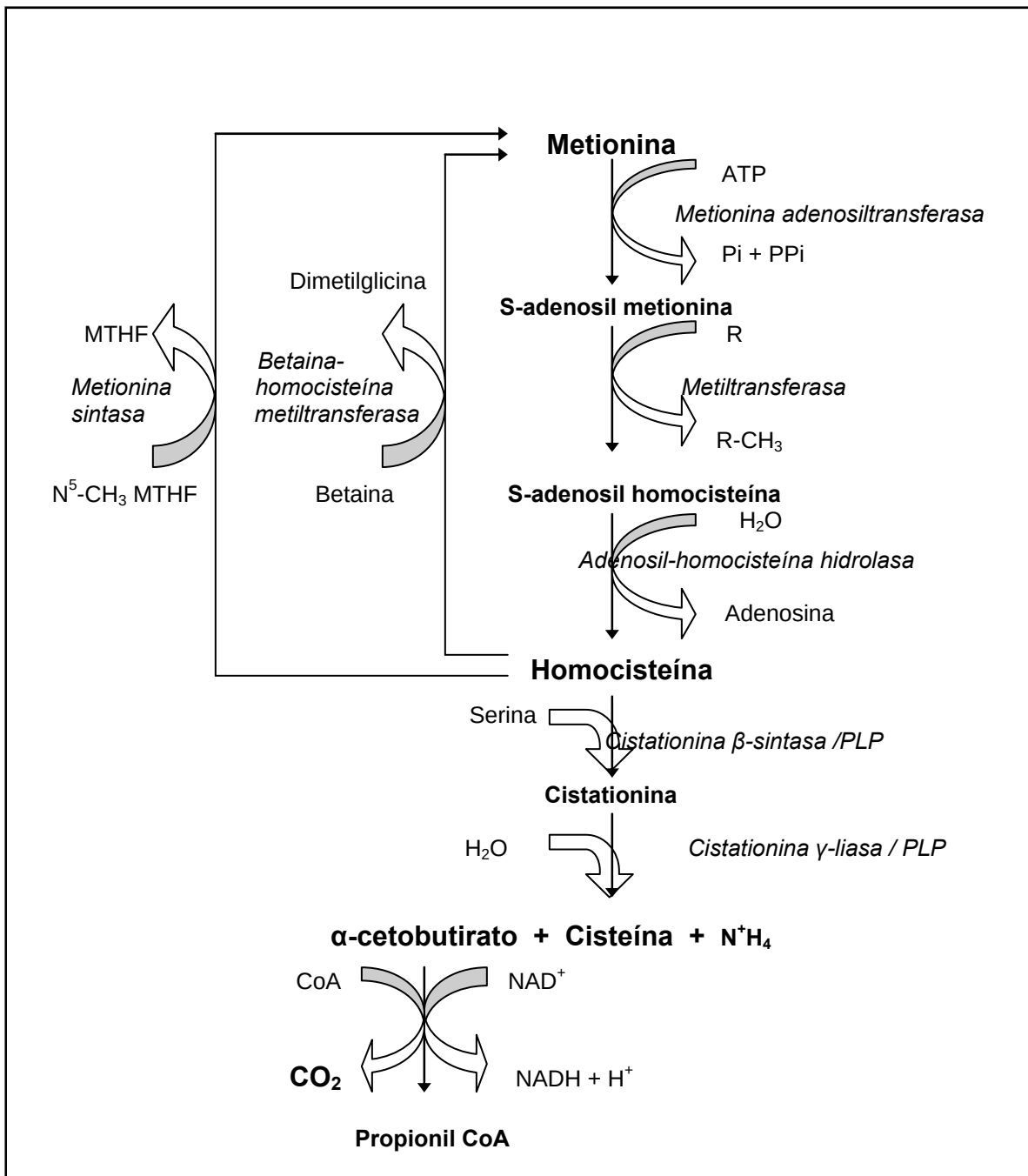


Figura 1. Esquema del metabolismo de la metionina [15].

2.2 Hiperhomocisteinemia.

El término hiperhomocisteinemia (**Hhcy**) se utiliza para designar al fenómeno clínico que consiste en la elevación de las concentraciones de Hcy en plasma. Actualmente se reconoce que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular [1, 2]. Asimismo, en estudios recientes se ha observado que la hiperhomocisteinemia es un predictor moderado de trastornos cognitivos como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y la demencia senil [16, 17].

Comúnmente, el diagnóstico de hiperhomocisteinemia se realiza cuantificando los niveles plasmáticos de homocisteína total (**Hcyt**) en estado de ayuno; los valores considerados como normales se sitúan entre los **5 y 15 $\mu\text{mol/L}$** . No obstante, algunos autores sugieren que en presencia de otros factores de riesgo asociados a hiperhomocisteinemia (tabaquismo, menopausia o edad) los valores deberán ser menores a **12 $\mu\text{mol/L}$** [1]. Se ha observado que en algunos casos, la determinación de las concentraciones plasmáticas de Hcy no es el indicador más adecuado para diagnosticar hiperhomocisteinemia, debido a que algunos sujetos presentan niveles normales en ayuno pero elevaciones anormales en condiciones postprandiales. Para evidenciar estos casos se ha propuesto la determinación de los niveles de Hcyt en plasma después de haber suministrado una carga oral de **0.1 g de metionina / kg de peso (COM)** [5]. La COM induce un aumento transitorio en las concentraciones de Hcy circulante con un pico máximo a las 8 horas post-carga. Aunque no se han determinado claramente los límites de referencia para estas concentraciones, se considera que hay hiperhomocisteinemia si los valores medidos son mayores a dos desviaciones estándar por arriba del valor promedio. Asimismo, en un estudio realizado en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN) por López

Alarcón en adultos sanos, mujeres menopáusicas y pacientes infartados se sugiere que los niveles plasmáticos post-carga no deben ser mayores a **34.9 $\mu\text{mol/L}$** [18]. La COM es una prueba muy útil para identificar pacientes en quienes el metabolismo de la homocisteína pudiera estar alterado a pesar de tener una determinación basal en ayuno considerada como normal.

2.3 Fundamento de la prueba de aliento con ^{13}C -metionina.

El fundamento de las pruebas de aliento consiste en la recuperación de **carbono 13** presente en el CO_2 exhalado después de haber suministrado una dosis oral de un sustrato oxidable enriquecido con este átomo. Para este propósito se pueden utilizar aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos grasos y otros compuestos orgánicos marcados en diferentes posiciones de la molécula dependiendo del interés particular de cada estudio.

El carbono 13 situado en la posición 1 de la $1\text{-}^{13}\text{C}$ -metionina se conserva a lo largo de todo el proceso catabólico que concluye cuando la cistationina es desdoblada en cisteína, NH_3 y α -cetobutirato. Este último se condensa con una coenzima A para producir propionil-coA y una molécula de $^{13}\text{CO}_2$. El $^{13}\text{CO}_2$ generado durante esta reacción es liberado de la célula hepática al torrente sanguíneo, que después del intercambio gaseoso, modifica la relación de $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ en el aliento. El incremento en la relación de $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ será proporcional a la cantidad de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -metionina que haya sido catabolizada por la vía de transulfuración [6]. De acuerdo con los antecedentes de este proyecto, un paciente con hiperhomocisteinemia diagnosticado por la COM tendrá una menor capacidad oxidativa que un sujeto sano, y por lo tanto, una menor cantidad de $^{13}\text{CO}_2$ en el aliento.

La 1-¹³C-metionina ha sido utilizada en trabajos previos para estimar la capacidad oxidativa de las células mitocondriales del hígado. En un estudio realizado en 20 sujetos sanos, se observó que después de suministrar una dosis oral de 2 mg de ¹³C-metionina /kg de peso, la excreción de ¹³CO₂ en el aliento alcanzó un pico máximo (4.76% ± 0.9% de la dosis suministrada) entre los 30 y 60 minutos [8]. En otro estudio se comparó la capacidad de oxidación de este aminoácido en sujetos sanos y en sujetos con esteatosis y cirrosis [6]. Se observó que a los 60 minutos el enriquecimiento de carbono 13 en los sujetos con esteatosis fue 47% menor que en los sujetos sanos (18.8 ± 12 vs. 36 ± 6.1% dosis/hora, p <0.05). A su vez, el enriquecimiento en pacientes con cirrosis fue 60% menor al compararlo con el grupo de pacientes con esteatosis (7.5 ± 3.4 vs. 18.8 ± 12 % dosis/hora, p < 0.05)

Hasta el momento no hay ningún reporte publicado en el que se haya utilizado la 1-¹³C-metionina como un indicador del metabolismo de la Hcy en pacientes con hiperhomocisteinemia. En este proyecto se pretende evaluar el uso de una dosis de metionina marcada con carbono 13 para monitorear problemas en el metabolismo de la homocisteína cuantificando el marcaje isotópico en el CO₂ exhalado en el aliento.

3. Planteamiento del Problema.

Se ha comprobado que la Prueba de Aliento con ^{13}C -metionina es útil para identificar afectaciones en el metabolismo hepático de pacientes con cirrosis y esteatosis. El decremento en la tasa de oxidación de la ^{13}C -metionina en sujetos con hiperhomocisteinemia diagnosticados por la COM, podría utilizarse como un indicador de las afectaciones en el metabolismo de este aminoácido que caracterizan a este trastorno metabólico. En este trabajo preliminar se pretende elaborar un diseño de prueba de aliento que nos permita establecer la factibilidad de este método para el diagnóstico de hiperhomocisteinemia en población adulta.

4. Justificación.

La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular. En algunos pacientes se ha observado que la medición de los niveles plasmáticos de homocisteína en estado de ayuno no es un indicador satisfactorio para su diagnóstico. Para evidenciar estos casos se ha propuesto la determinación de los niveles plasmáticos de homocisteína después de suministrar una carga oral de 0.1 g de L-metionina por kg de peso. Sin embargo, se han observado algunas reacciones desfavorables al utilizar este método, sobre todo en aquellos pacientes que tienen problemas con el manejo de este metabolito. El enriquecimiento de carbono 13 en el CO₂ exhalado después de suministrar una dosis oral de 1-¹³C metionina, podría ofrecer información muy valiosa sobre el comportamiento y el manejo de este metabolito en el organismo. La prueba de aliento es un método no-invasivo que por sus características facilita de manera sumamente importante la toma, el almacenamiento y el análisis de las muestras. Hasta el momento no existe ningún estudio publicado sobre la prueba de aliento con 1-¹³C metionina y el diagnóstico de hiperhomocisteinemia.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo General.

Comparar el enriquecimiento de carbono 13 exhalado en el CO₂ del aliento después de una dosis oral de ¹³C-metionina entre un grupo de pacientes con niveles normales de Hcy y un grupo de pacientes con hiperhomocisteinemia diagnosticados por la COM.

5.2 Objetivos Específicos.

- Caracterizar las curvas de enriquecimiento isotópico en el aliento de pacientes con hiperhomocisteinemia.
- Establecer el grado de correlación entre la tasa de oxidación de la ¹³C-metionina y las concentraciones de homocisteína postcarga.
- Comparar los niveles plasmáticos de vitamina B6, ácido fólico y vitamina B12 entre los grupos de estudio.

6. Marco Teórico.

6.1 Definición de variables.

- Hiperhomocisteinemia: variable numérica continua expresada en $\mu\text{mol/L}$. El punto de corte para el diagnóstico de hiperhomocisteinemia en estado de ayuno es de **15 $\mu\text{mol/L}$** y de **35 $\mu\text{mol/L}$** a las 8 horas poscarga.
- Enriquecimiento de carbono 13 en aliento: variable numérica continua expresada en unidades **Delta 13 PDB** y **% acumulado de dosis oxidada**. Esta variable refleja la tasa de oxidación de la ^{13}C -metionina.
- Cargo Oral de Metionina: método de diagnóstico que permite identificar sujetos con hiperhomocisteinemia postprandial. Consiste en cuantificar los niveles de Hcy 8 horas después de haber suministrados una carga de **0.1 g de L-metionina** por kg de peso.
- Prueba de aliento con ^{13}C -metionina: método que consiste en cuantificar el incremento en el enriquecimiento de **carbono 13** en el **CO_2** exhalado en el aliento en diferentes intervalos de tiempo después de suministrar por vía oral una dosis de **1- ^{13}C -metionina**.
- Espectrometría de masas de relaciones isotópicas: técnica analítica que determina la relación isotópica de **$^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$** en la muestra de aliento.
- Carbono 13: isótopo **no radiactivo** que se encuentra presente en la naturaleza en una abundancia de **1.108 %** en promedio. Algunos productos son enriquecidos con este átomo como es el caso del reactivo que será utilizado en el presente trabajo (L-Metionina, 1- ^{13}C , 99%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)

7. Hipótesis.

El enriquecimiento de carbono 13 en el CO₂ del aliento de sujetos con hiperhomocisteinemia diagnosticados por la COM será significativamente menor que el enriquecimiento en sujetos con niveles normales de homocisteína. Se detectará una correlación aceptable entre la oxidación de la ¹³C-metionina y los niveles de Hcy poscarga.

8. Metodología.

8.1 Diseño.

Se realizará un estudio para determinar si la prueba de aliento con ¹³C-metionina es útil para identificar hiperhomocisteinemia en sujetos adultos, al comparar la tasa de oxidación de este metabolito medido de manera indirecta en el aliento de un grupo control y un grupo de casos previamente diagnosticados. El presente trabajo se llevará a cabo en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

8.2 Población de estudio.

Se reclutarán sujetos que hayan participado en estudios previos realizados en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN) que cuenten con determinaciones de Hcyt en estado de ayuno y poscarga no mayor a 3 meses antes de la realización del presente trabajo. Se seleccionaran por conveniencia 10 sujetos sanos con niveles normales de Hcyt (<12 µmol/L en ayuno y <35 µmol/L poscarga) y 10 sujetos con hiperhomocisteinemia (<12 µmol/L en ayuno y **>35 µmol/L a las 6 horas poscarga**). Debido a que no existe ningún antecedente sobre la oxidación de la ¹³C-metionina en sujetos con hiperhomocisteinemia, se elegirán por

conveniencia 10 sujetos por grupo para contar con poder estadístico que le confiera validez a los análisis propuestos en el apartado 8.5.

8.3 Criterios de exclusión.

Aquellos sujetos que hayan ingerido alcohol etílico o ácido acetilsalicílico 48 horas antes de realizar la prueba de aliento, que hayan sido diagnosticados o exista el indicio de enfermedad hepática, enfermedad renal crónica o diabetes, que hayan recibido un suplemento vitamínico en un tiempo menor a tres meses antes de participar en este estudio o que por su propia voluntad decidan retirarse del mismo.

8.4 Procedimientos.

Los pacientes serán citados a las ocho de la mañana para que asistan a la UIMN en estado de ayuno. Se solicitará que reposen sentados durante 20 minutos y a continuación se medirá la producción de CO₂ (VCO₂) por calorimetría indirecta de circuito abierto durante 30 minutos. Posteriormente los pacientes serán pesados y medidos y se tomará una muestra de sangre por punción venosa (7 mL) y una muestra de aliento basal. Después se suministrará una dosis oral de 2.5 mg / kg de peso de 1-¹³C-metionina diluida en 200 ml de agua saborizada. Cada 10 minutos se colectarán muestras de aliento por duplicado durante dos horas en tubos Exetainer que serán almacenados a temperatura ambiente.

La muestra de sangre se obtendrá por punción venosa en tubos Vacutainer con EDTA. La sangre se centrifugará a 2500 rpm durante 15 minutos para separar el plasma y depositarlo en alícuotas de 1 mL en cuatro viales que serán almacenados inmediatamente a -70 °C.

8.5 Medidas y Determinaciones.

Peso: será registrado en una báscula digital TANITA BWB-700 con capacidad de 200 kg y una sensibilidad de 0.1 gramos.

Talla: se medirá utilizando un estadímetro SECA 222 con un rango de medición de 6 a 230 centímetros y sensibilidad de 1 mm.

Producción de CO₂: Se medirá por calorimetría indirecta de circuito abierto con un monitor metabólico Deltratac II (DATEX Deltratac II Metabolic Monitor, Heisinki, Finlandia).

Metabolitos: La concentración de homocisteína y de vitamina B6 en plasma se medirá por cromatografía de líquidos de alta resolución. La vitamina B12 y el ácido fólico por radio inmuno ensayo con estuches comerciales.

Enriquecimiento isotópico en muestras de aliento: Se medirá por espectrometría de masas de relaciones isotópicas en un espectrómetro de masas Finnigan BreatMat Plus (Bremen, Alemania).

8.6 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizará el programa SPSS versión 13.0 para Windows. Los datos serán expresados como media $\pm$ desviación estándar. El enriquecimiento de carbono 13 se reportará en unidades Delta 13 PDB y en porcentaje acumulado de dosis oxidada a los 60, 90 y 120 minutos. La comparación entre grupos se realizará con una prueba "t" de Student y el grado de correlación entre el % acumulado de dosis y la concentraciones de Hcy poscarga por medio de un análisis de correlación de Pearson.

8.7 Aspectos éticos.

Los procedimientos propuestos en la metodología de este estudio se apegarán a los lineamientos éticos contemplados para la investigación en seres humanos en la declaración de Helsinki, considerando un tipo de investigación de riesgo mínimo. Este proyecto fue aprobado por el Comité Local de Investigación en Salud con número de registro **R-2009-3603-24** del cual se anexa un comprobante en el apartado de anexos. Para su realización se solicitará por escrito la autorización del paciente a través de una carta de consentimiento informado en donde se describe detalladamente el proceso del estudio y se brinda la siguiente información:

- Lugar en donde se realizará la investigación y los fines de ésta.
- Se garantiza la confidencialidad de los datos recabados y de los resultados obtenidos.
- Los pacientes identificados con hiperhomocisteinemia recibirán orientación alimentaria y serán canalizados con su médico para recibir atención oportuna.
- Libertad de abandonar el estudio en el momento que el paciente lo decida sin afectar su derecho a la información de los resultados obtenidos hasta ese momento.

9. Plan de análisis.

Actividades	2 0 0 9				2 0 1 0		
	ENE/FEB	MAR/AGO	SEP/NOV	DIC	ENE/FEB	MAR/ABR	MAY/JUN
Adquisición de materiales, consumibles y reactivos.							
Logística para reclutamiento de pacientes y almacenamiento de muestras.							
Selección y reclutamiento de pacientes.							
Deteminaciones químicas.							
Recolección de datos.							
Análisis e interpretación de datos							
Escritura y revisión de artículo.							
Envío para publicación.							

10. Resultados esperados.

Al finalizar este proyecto de investigación esperamos obtener un enriquecimiento de carbono 13 en el aliento, significativamente menor en el grupo de sujetos con hiperhomocisteinemia. Este hecho indicaría que la capacidad metabólica de estos sujetos se encuentra disminuida como lo indican los elevados niveles de Hcy alcanzados durante la COM. Por lo tanto, el enriquecimiento de carbono 13 correlacionará inversamente con los niveles de Hcy a las 8 horas poscarga. Estos resultados nos indicarían la factibilidad técnica de utilizar la tasa de oxidación de la 13 C-metionina como un parámetro útil para el diagnóstico de hiperhomocisteinemia mediante un método no invasivo.

Hasta el momento no existe ningún reporte publicado en donde se utilice la prueba de aliento con 13 C-metionina para identificar sujetos con este trastorno metabólico. Este trabajo preeliminar nos permitiría determinar el potencial de esta prueba para elaborar en el corto plazo, proyectos de investigación encaminados a determinar la validez y la confiabilidad de esta prueba, que por sus características resulta sumamente conveniente y ventajosa para ser aplicada en proyectos poblacionales en los que es deseable contar con técnicas que faciliten y simplifiquen el trabajo en campo. Como ya se comentó, la prueba de aliento no requiere de personal especializado para la toma de muestra, que además puede ser almacenada por más de 90 días a temperatura ambiente. Asimismo, el hecho de no utilizar muestras sanguíneas reduce considerablemente, en términos de seguridad sanitaria, los riesgos de contagio y facilita significativamente el manejo de material peligroso y de desechos biológicos.

11. Bibliografía.

1. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, Atherosclerosis and Thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 165-176.
2. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325: 1202-8.
3. Faeb D, Chiolero A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly* 2006; 136: 745–756.
4. Consultado el 01 de Marzo de 2010: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
5. Van der Griend R, Haas FJ, Duran M, Biesma DH, Meuwissen OJ, Banga JD. Methionine loading test is necessary for detection of hyperhomocysteinemia. *J Lab Clin Med* 1998; 132: 67-72.
6. Spahr L, Negro F, Leandro G et al. Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the ¹³C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis. *Med Sci Monit* 2003; 9: 6-11.
7. Milazzo L, Piazza M, Sangaletti O et al. [¹³C] methionine breath test: a novel method to detect antiretroviral drug-related mitochondrial toxicity. *JAC* 2004; 1-6.
8. Armuzzi A, Marcoccia S, Zocco M et al. Non-invasive assessment of human mitochondrial function through the ¹³C-methionine breath test. *Scand J Gastroenterol* 2000; 6: 650-3.
9. Kohlmeier M. *Nutrient Metabolism*. E.U.A, Academic Press. 2003: 339.
10. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of biochemistry*. 2 Ed: New York. Worth Publishers, Inc, 1993.
11. Finkelstein JD. "Methionine metabolism in mammals". *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-57.

12. MacCoss MJ. "Measurement of intracellular sulphur amino acid metabolism in humans".
AmJ Physiol Endocrinol Metab 2001; 280: 947-55.
13. Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross K. Modern Nutrition in health and disease. Selhub J, Jacques PF, Wilson WF, Rush D, Rosenberg IH. "Vitamin Status and Intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population". JAMA 1990; 270: 2693-8.
14. Stipanuk H. Martha. *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. W. B. Saunders Company, EUA, 2000: 265-267.
15. Miller JW, Green R, Ramos MI, Allen LH, Mungas DM, Jagust WJ. "Homocysteine and cognitive function in the Sacramento Area". Am J Clin Nutr 2003; 78: 441-7.
16. Martínez LE, Martínez HR, Del Roble M, Sampallo E, Aguirre A, González HC, Cantú LA, Garza NL, Rivas MA. Niveles Séricos de Homocisteína en Enfermedad de Parkinson. Rev Mex Neuroci 2003; 4: 413-418.
17. Pegueros V . "Efecto de la complementación con ácido fólico y vitaminas B6 y B12 sobre las concentraciones de Hcy en mujeres post-menopáusicas". Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, 2007.

CARTA DE COSENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Título del Proyecto: “DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE ALIENTO CON ^{13}C METIONINA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON HIPERHOMOCISTEINEMIA”.

Estimado Paciente:

Solicitamos su colaboración para participar en un estudio de investigación cuyo objetivo es elaborar una prueba de aliento para el diagnóstico de hiperhomocisteinemia. Actualmente se sabe que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Beneficios: A partir de la información recabada en este estudio, se podría identificar si usted se encuentra en riesgo de padecer este trastorno metabólico. De ser así usted recibirá consejo dietario y será canalizado con su médico para ser atendido. La hiperhomocisteinemia puede ser tratada para evitar el desarrollo de enfermedades más graves.

Riesgos: Para llevar a cabo esta investigación será necesario suministrar oralmente una dosis de aproximadamente 200 mg del aminoácido metionina y obtener una muestra de sangre de 10 mL. También se obtendrán muestras de aliento; para lo cual usted tendrá que soplar a través de un popote cada 10 minutos hasta completar 2 horas. Esta prueba no implica ningún daño para su salud.

Si usted está de acuerdo en participar en este proyecto de investigación por favor firme este formato. Se le informa que tiene la libertad de abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto afecte la atención, accesibilidad y la calidad de los servicios médicos que otorga el IMSS. Le informamos que todos los datos que usted nos proporcione serán tratados con absoluta confidencialidad. Si desea hacer alguna pregunta o aclaración que considere pertinente estamos a sus ordenes al teléfono: 56 27 69 44 en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, 4º. Piso Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS con Jorge Maldonado Hernández. Agradecemos apreciablemente su colaboración.

Jorge Maldonado Hernández.

Número de registro en el Comité Local de Investigación: R-2009-3603-24

Matricula: 99091869.

Nombre del Paciente: _____ Firma: _____

Nombre del Testigo 1: _____ Firma: _____

Nombre del Testigo 2: _____ Firma: _____