



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO  
Facultad de Medicina  
Escuela de Tecnología Médica

# **ACTIVIDAD PROCOAGULANTE DEL FACTOR TISULAR PLAQUETARIO EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO II**

Tesis de pregrado para optar al título de Tecnólogo Médico con mención en  
Bioanálisis Clínico, Inmunohematología y Banco de Sangre

Autores:

Nicole Macarena Hernández Alvarado, Teresa Andrea Nilo Ríos.

Tutor: BQ. Olga Teresa Panes Becerra.

Santiago de Chile 2015

*Dedicatoria y agradecimientos*

*A nuestros padres por ser el pilar fundamental en nuestra educación. A nuestra familia por su incondicional apoyo y al Laboratorio de Trombosis y Hemostasia de la Universidad Católica de Chile por permitirnos realizar nuestra estudio en sus dependencias.*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	10
CAPÍTULO N°1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO .....	12
1.1 DIABETES .....	12
1.2 DIABETES Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR .....	13
1.3 HEMOSTASIA Y DIABETES TIPO II.....	14
1.4 DIABETES Y FUNCIÓN ENDOTELIAL.....	16
1.5 PLAQUETAS .....	16
1.6 COAGULACIÓN, FACTOR TISULAR Y PLAQUETAS .....	18
CAPÍTULO N°2: HIPÓTESIS .....	22
CAPÍTULO N°3: OBJETIVO .....	23
CAPÍTULO N°4: OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
CAPÍTULO N°5: MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
5.1 TIPO DE ESTUDIO .....	25
5.2 LUGAR DE REALIZACIÓN .....	25
5.3 POBLACIÓN EN ESTUDIO .....	25
5.4 TOMA DE MUESTRA .....	26
5.5 MEDICIONES BIOQUÍMICAS Y HEMATOLÓGICAS .....	27
5.6 VARIABLE ESTUDIADAS .....	27
5.6.1 Tiempo de Lisis del Coágulo .....	27
5.6.2 Agregación .....	28
5.6.3 Secreción Plaquetaria .....	28
5.6.4 Generación de Trombina.....	29
5.6.5 Actividad Pro Coagulante .....	30
5.6.6 Citometría de Flujo .....	30
5.6.7 Inhibidor plasmático de la fibrinólisis .....	30

5.6.8 Complejos Trombina/ Antitrombina .....	30
5.6.9 Marcadores de daño oxidativo (AOPP) .....	31
5.6.10 Cuantificación de TNF- $\alpha$ e Interleuquina 6 (IL-6).....	31
5.6.11 Proteína C reactiva (PCR).....	31
5.6.12 Cuantificación de Ag y unión a colágeno del Factor von Willebrand (FvW).....	31
5.6.13 Cuantificación de Fibrinógeno .....	31
5.6.14 Proteína C .....	32
5.6.15 Antitrombina III .....	32
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	33
CAPÍTULO N°6: RESULTADOS.....	34
6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN .....	34
6.2 FUNCIÓN PLAQUETARIA.....	36
6.3 CITOMETRÍA DE FLUJO .....	38
6.4 MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	39
6.5 MARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL.....	41
6.6 CUANTIFICACIÓN DE FIBRINÓGENO .....	42
6.7 INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN .....	43
6.8 ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA EN PACIENTES CON DM II Y CONTROLES. ....	45
6.9 GENERACIÓN DE TROMBINA <i>EX VIVO</i> E <i>IN VIVO</i> .....	46
6.10 APC-FT .....	51
CAPÍTULO N°7: DISCUSIÓN .....	52
CAPÍTULO N°8: CONCLUSIÓN .....	56
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1: GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA PLAQUETARIA .....	18
TABLA N°2: CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN.....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1: CURVA DE FORMACIÓN Y LISIS DEL COÁGULO.....	28
FIGURA N°2: PARÁMETROS DE LA TÉCNICA GENERACIÓN DE TROMBINA.....	29
FIGURA N°3: AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON AGONISTAS EN CONCENTRACIONES SUB UMBRALES .....	36
FIGURA N°4: SECRECIÓN PLAQUETARIA DE SEROTONINA .....	37
FIGURA N°5: CITOMETRÍA DE FLUJO .....	38
FIGURA N°6: MARCADORES DE INFLAMACIÓN .....	39
FIGURA N°7: MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	40
FIGURA N°8: MARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL .....	41
FIGURA N°9: CONCENTRACIÓN DE FIBRINÓGENO.....	42
FIGURA N°10: PORCENTAJE DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA C .....	43
FIGURA N°11: PORCENTAJE DE CONCENTRACIÓN DE AT III PLASMÁTICA.....	44
FIGURA N° 12: TIEMPO LISIS DEL COAGULO EN PLP Y PLAQUETAS ACTIVADAS CON AGONISTAS PLAQUETARIOS .....	45
FIGURA N°13: CONCENTRACIONES DE PAI-1 .....	46
FIGURA N°14: POTENCIAL ENDOGENO DE GENERACIÓN DE TROMBINA ...	47
FIGURA N°15: MÁXIMA GENERACION DE TROMBINA .....	48
FIGURA N°16: INDICE DE VELOCIDAD GENERACION DE TROMBINA.....	49
FIGURA N°17: CONCENTRACIÓN DE COMPLEJOS TROMBINA ANTI- TROMBINA.....	50
FIGURA N°18: ACTIVIDAD PRO COAGULANTE DEPENDIENTE DE FT PLAQUETARIO .....	51

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

ANEXO N°1: APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA.....	63
ANEXO N°2: CONSENTIMIENTOS INFORMADOS PACIENTES CON Y SIN EVENTOS CARDIOVASCULARES Y CONTROLES SANOS.....	64

## **ABREVIATURAS**

**DM:** Diabetes Mellitus.

**FT:** Factor tisular.

**DM2:** Diabetes Mellitus tipo II.

**APC-FT:** actividad pro coagulante dependiente de Factor Tisular.

**FX:** Factor Stuart o factor X.

**PRP:** Plasma Rico en Plaquetas.

**DM1:** Diabetes Mellitus tipo I.

**HbA1c:** Hemoglobina glicosilada.

**AVC:** Accidente vascular cerebral.

**FVII:** Factor VII.

**FVIII:** Factor VIII.

**FvW:** Factor von Willebrand.

**PS:** Proteína S.

**ATIII:** Antitrombina III.

**PAI-1:** Inhibidor del activador del plasminógeno.

**TXA2:** Tromboxano A2.

**PGI2:** Prostaciclina I2.

**GP IIb-IIIa:** Glicoproteína IIb-IIIa.

**PCR:** Proteína C Reactiva.



**ON:** Óxido Nítrico.

**ADP:** Adenosín di fosfato.

**VEGF:** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

**IL-1:** Interleuquina 1.

**IL-6:** Interleuquina 6.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

**GP:** Glicoproteína.

**FVII:** Factor VII.

**FVIIa:** Factor VII activado.

**FXa:** Factor X activado.

**HGO:** Hipoglicemiantes orales.

**ACD:** Ácido cítrico, Citrato, Dextrosa.

**CK:** Creatinina Kinasa.

**PPP:** Plasma Pobre en Plaquetas.

**RIS:** Ristocetina.

**TRAP:** Péptido Activador del Receptor de Trombina.

**TLC:** Tiempo de lisis del coágulo.

**AUC:** Área bajo la curva.

**tPA:** Activador tisular del Plasminógeno.

**AA:** Araquidonato.

**EPI:** Epinefrina.

**COL:** Colágeno.

**NS:** No estimuladas.

**Ag:** Antígeno.

**%T:** Porcentaje de trasmitancia.

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography.

**APC:** Actividad pro coagulante.

**SF:** Suero Fisiológico.

**Vi:** Índice de Velocidad.

**PGE1:** Prostaglandina E1.

**PLP:** Plasma libre en plaquetas.

**CAT:** Generación de trombina automatizada.

**ETP:** Potencial endógeno de producir trombina.

**PEAK:** Concentración máxima de trombina.

**TAT:** Complejo trombina-antitrombina.

**LDL:** Low density lipoprotein.

**PUC:** Pontificia Universidad Católica de Chile.

**ELISA:** Enzimo Inmuno análisis.

## RESUMEN

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por el déficit en la secreción y/o función de la insulina, hormona encargada de regular la glicemia. Personas que presentan esta enfermedad poseen un mayor riesgo de sufrir eventos cardiovasculares con un índice de mortalidad de un 80%.

Estos poseen diversos factores que afectaran al estado protrombótico, como alteración en la función plaquetaria, daño endotelial, y aumento de mediadores de inflamación y aumento del Factor Tisular (FT) plasmático.

El aumento de FT circulante se ha relacionado con un aumento del estado protrombotico, sin embargo, se desconoce si el aumento de la cantidad de este, se asocia a un aumento en su función.

Las plaquetas poseen FT y su activación sería crucial en el proceso protrombótico, por tanto se propuso determinar si en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II (DM2) la actividad pro coagulante dependiente de FT (APC-FT) en plaquetas está aumentada.

Se estudiaron 15 pacientes con DM2 y 15 controles sanos, pareados por sexo y edad. A los que se les determinó la APC-FT en plaquetas lavadas por generación de Factor X activado y generación de trombina por test calibrado en plasma rico en plaquetas activadas con agonistas plaquetarios. Además se realizaron estudios de función plaquetaria, marcadores plasmáticos de activación de la coagulación, inflamación, daño endotelial y estrés oxidativo.

No se obtuvo diferencia significativa en función plaquetaria, generación de trombina, marcadores de inflamación o estrés oxidativo ni en la actividad pro coagulante dependiente de FT plaquetario, entre el grupo en estudio y el grupo control. Sin embargo, la medición de P-selectina por citometría de flujo mostró un aumento estadísticamente significativo en DM2 que en controles, denotando una activación plaquetaria *in vivo*.

La ausencia de diferencias con respecto a controles puede ser explicada a que los pacientes DM2 seleccionados en este estudio, además del uso de hipoglicemiantes e insulina, se encontraban utilizando estatinas, las cuales disminuyen tanto los parámetros de inflamación como de APC-FT en plaquetas.

**Palabras claves:** Diabetes, Factor Tisular, Hipercoagulabilidad.

## **CAPÍTULO N°1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Diabetes**

La diabetes es un trastorno metabólico con diversas causantes. Se caracteriza por hiperglicemia crónica y trastornos en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas debido a anomalías en la secreción o efecto de la insulina en tejidos blancos. Con el tiempo la enfermedad puede causar daños, disfunción e insuficiencia de diversos órganos <sup>(1)</sup>.

La hiperglicemia característica de esta enfermedad incluye entre sus síntomas poliuria, polidipsia y polifagia, triada característica de esta enfermedad, pérdida de peso y en ocasiones visión borrosa además de un aumento en la susceptibilidad a infecciones y deterioro del crecimiento <sup>(2)</sup>.

Existen principalmente tres tipos de diabetes: Diabetes Gestacional; este tipo de diabetes comienza usualmente el segundo trimestre de embarazo, estas mujeres y sus hijos corren un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo II en un futuro. Diabetes Mellitus tipo I (DM1); las células  $\beta$  pancreáticas secretoras de insulina son destruidas por acción autoinmune, se manifiesta principalmente en niños y jóvenes sin antecedentes previos. La Diabetes Mellitus tipo II (DM2) también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta es una enfermedad crónica causada por una combinación entre una resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta frente a la secreción compensatoria de ésta por parte del cuerpo lo que deriva en una hiperglicemia <sup>(2)</sup>. En este estudio nos enfocaremos en pacientes con DM2.

La DM2 se ve asociada en gran parte al estilo de vida de la población, siendo los principales factores de riesgo el sedentarismo, obesidad, mala alimentación e hipertensión arterial, entre otras <sup>(3)</sup>. El establecimiento de estos factores se refleja en el aumento del índice de diabéticos en la población de países desarrollados.

Para declarar a un paciente diabético se debe cumplir con al menos 1 de estos 3 criterios, lo cual debe ser confirmado posteriormente <sup>(1)</sup>:

1. Glicemia (en cualquier momento)  $\geq 200$  mg/dL, asociada a síntomas clásicos, como la poliuria, polidipsia, polifagia, etc.
2. Dos o más glicemias  $\geq 126$  mg/dL.
3. Respuesta a la sobrecarga a la glucosa alterada con una glicemia a los 120 minutos post sobrecarga  $\geq 200$  mg/dL.
4. Hemoglobina Glicosilada (HbA1c)  $> 6,5\%$ .

Hasta la fecha la DM2 representa alrededor del 85 al 95% del total de casos de diabetes en países de ingresos altos y podría ser responsable de un porcentaje aún mayor en países de ingresos medios y bajos <sup>(4)</sup>. Estos pacientes presentan un estado de hipercoagulabilidad, lo que incrementa el riesgo de padecer eventos cardiovasculares, el 80% de los pacientes con DM2 mueren por eventos trombóticos y el 65% de estas muertes es resultado de un evento cardiovascular <sup>(5)</sup>.

## **1.2 Diabetes y Enfermedad Cardiovascular**

Las alteraciones metabólicas (por lo general crónicas) y hematológicas características de los diabéticos favorecen la progresión precoz, severa y rápida de la enfermedad coronaria que junto con otros factores de riesgo como hipertensión arterial, obesidad, dislipidemia, y enfermedades

asociadas, le confieren una alta tasa de mortalidad, limitan la calidad y esperanza de vida <sup>(6)</sup>.

Entre algunas de las consecuencias producto de la diabetes son:

- Aumento el riesgo de cardiopatía y accidente vascular cerebral (AVC).
- Neuropatía combinada con la reducción del flujo sanguíneo.
- Retinopatía diabética.
- Nefropatía diabética.

Actualmente se ha demostrado que el control glicémico de este tipo de pacientes no influye sobre el riesgo cardiovascular <sup>(7)</sup>, aparentemente los factores no relacionados a la glicemia, como la hipertensión, la dislipidemia y la hipercoagulabilidad juegan un rol importante en las complicaciones cardiovasculares. La mayoría de los eventos isquémicos se precipitan por rotura de la placa aterosclerótica, activación plaquetaria y la trombosis resultante de esto <sup>(8,9)</sup>.

### **1.3 Hemostasia y Diabetes tipo II**

En la DM2 se producen diversas alteraciones del sistema de coagulación, como aumento del fibrinógeno, factor VIII (FVIII) y factor de Von Willebrand (FvW) <sup>(10)</sup> que inducen a un estado protrombótico con tendencia a la hipercoagulabilidad. Investigaciones realizadas determinaron la concentración de proteína S (PS), antitrombina III (ATIII) e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1); se concluyó que los inhibidores fisiológicos de la coagulación PS y ATIII son menores en la población diabética, mientras que las concentraciones de PAI-1 según este mismo son significativamente mayores a los valores de referencia, llevando a una disminución de la fibrinólisis <sup>(11)</sup>. Por

otra parte se destaca la presencia de una hiperagregabilidad plaquetaria, disfunción endotelial <sup>(12,13)</sup>, estrés oxidativo y alteraciones metabólicas.

La hiperagregabilidad plaquetaria, estaría dada en pacientes diabéticos por los cambios en la función plaquetaria, consecuencia de una hipersensibilidad a agonistas, aumento de tromboxano A2 (TXA2) y disminución de prostaciclina (PGI2) <sup>(14,15)</sup>. La hiperglicemia crónica produciría cambios bioquímicos en la membrana plaquetaria, debido a que en estas condiciones se genera glicosilación no enzimática de proteínas, incluyendo aquellas que forman parte de la membrana plaquetaria, esto induce cambios en su estructura, modificando a su vez la permeabilidad de esta por alteración de fosfolípidos de membrana. Lo que llevaría a una sobreexpresión de receptores plaquetarios (P-selectina y glicoproteínas IIb-IIIa [GPIIb-IIIa]) y a una mayor interacción de su ligando como el fibrinógeno <sup>(16)</sup>.

Las plaquetas poseen una concentración intracelular de glucosa similar al plasma, reflejo de su entorno extracelular, lo que se asocia al aumento en la formación de anión superóxido, actividad de la proteína C reactiva (PCR) y disminución de la generación de óxido nítrico (ON) plaquetario <sup>(17)</sup>. Esto producto de la resistencia a la insulina, propia de este tipo de pacientes, que induce un aumento en los ésteres de colesterol, triglicéridos y alteración del metabolismo lipídico desencadenando así un mayor riesgo ateroesclerótico.

Las plaquetas poseen un receptor para insulina funcional y capaz de autofosforilarse <sup>(18)</sup>. La insulina posee efectos inhibitorios en las plaquetas, disminuye la respuesta plaquetaria a ADP, colágeno, trombina y araquidonato al reducir el número de receptores adrenérgicos. En la DM2 disminuye el número y la afinidad del receptor plaquetario para insulina, lo que sugiere que la hiposensibilidad plaquetaria a esta hormona contribuye a la hiperactividad de la plaqueta <sup>(18)</sup>, sumando las alteraciones lipídicas y el efecto inhibitorio de las PGI2.



La hiperglicemia lleva a un aumento *in vivo* de calcio intraplaquetario <sup>(19)</sup> que desencadenaría la activación plaquetaria y la generación de cambios en los fosfolípidos de membrana, provocando un cambio en la asimetría de cargas de la membrana, exponiendo la carga negativa en la cara externa, que daría un ambiente óptimo para el ensamblaje y activación de los factores de coagulación.

#### **1.4 Diabetes y Función Endotelial**

En cuanto a la disfunción endotelial, se han encontrado en estos pacientes marcadores de daño endotelial aumentado, tales como la trombomodulina, moléculas de adhesión celular, PAI-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lipoproteínas asociadas con la fosfolipasa A2, mieloperoxidasas y paraoxonasa (enzima capaz de hidrolizar peróxidos lipídicos y moléculas inflamatorias) <sup>(20)</sup>, así como de marcadores de inflamación, PCR, interleuquina-1 (IL-1) e interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) y su receptor <sup>(21)</sup>. Estas sustancias proinflamatorias inducen un estado hipercoagulante por reducción de la actividad anticoagulante natural del endotelio.

#### **1.5 Plaquetas**

Las plaquetas cumplen una función vital y protagónica en el proceso de coagulación, a modo general los trombocitos más conocidos como plaquetas, son generados por la división de los megacariocitos en médula ósea, de un megacariocito por fragmentación se obtendrán alrededor de 1.000 a 5.000 plaquetas, las cuales se dirigirán a circulación <sup>(22)</sup>, no poseen núcleo y como parte de su estructura cuentan con una membrana rica en glicoproteínas (GP), gránulos alfa (fibrinógeno, FvW, Fibronectina, Tombospondina, Vitronectina, P-selectina) y gránulos densos (ADP, ATP, GTP, GDP, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>,

serotonina, fosfato), lisosomas, un sistema canicular y mitocondrias <sup>(22)</sup>. Las plaquetas a pesar de su estructura considerada simple en un principio como fragmento celular es capaz de intervenir en diversos procesos no sólo relacionados a la coagulación (como trombosis), sino también en procesos de inflamación, inmunidad y angiogénesis<sup>(23)</sup>. Esta capacidad de participar en tan diversos procesos se debe a que puede establecer una gran cantidad de interacciones celulares y de secretar distintos tipos de moléculas que participan en procesos como quimiotaxis, angiogénesis y regulación de la señalización celular <sup>(24)</sup>. Estas propiedades relacionan estrechamente a la función plaquetaria con enfermedades como asma, arterioesclerosis, enfermedades cardiovasculares y diabetes <sup>(23)</sup>. Para esto poseen diversas estructuras que le dan propiedades y características necesarias para desarrollar estas funciones esenciales en el organismo, como GP o integrinas que se encuentran en la membrana de la plaqueta, formadas por dos cadenas, una alfa y otra beta, capaces de permitir la interacción de componentes del extracelular (fibronectina y colágeno) con el intracelular y desencadenar una cascada de señalización. Las principales GP son el complejo GPIb-IX y GPIIa-IIIb, esta GP permite la unión con fibrinógeno, FvW y fibronectina<sup>(25)</sup> y así otras GP como se muestra en la siguiente tabla.

<b>Glicoproteína</b>	<b>CD</b>	<b>Integrina</b>	<b>Ligando</b>	<b>Función</b>
<b>GPIIb-IIIa</b>	CD41,CD61	$\alpha$ IIb $\beta$ 3	Fibrinógeno, FvW, Fibronectina, Vitronectina.	Agregación.
<b>GPIa-IIa</b>	CD49b, CD29	$\alpha$ 2 $\beta$ 1	Colágeno.	Adhesión.
<b>GPIc-IIa</b>	CD49e, CD29	$\alpha$ 5 $\beta$ 1	Fibronectina.	Adhesión.
<b>GPIB-IX-V</b>	CD42a,b,c,d		FvW, Trombina.	Adhesión, Agregación.
<b>GPIV</b>	CD36		Colágeno, Trombospondina.	Adhesión, Agregación.
<b>GPVI</b>			Colágeno.	Adhesión.
<b>GMP-140 (P-Selectina)</b>	CD62P			Interacción Plaqueta-leuco.
<b>PECAM</b>	CD31			Interacción Endotelio.

Tabla N° 1: Glicoproteínas de membrana plaquetaria (Extraído de Palomo I., 2009, pág. 462)

Dentro de las GP más importantes para la interacción con otros tipos celulares, se encuentran la P-selectina o CD62P y las Anexinas. La P-selectina está presente en los gránulos alfa y una vez activada se presenta en la membrana de las plaquetas <sup>(25)</sup>. Ésta CD62P es fundamental para la unión de las plaquetas y los leucocitos permitiendo su interacción, mientras que las Anexinas son capaces de unirse a fosfolípidos cargados negativamente un ejemplo de ello es la membrana plaquetaria cuando esta ya se ha activado <sup>(27)</sup>.

## 1.6 Coagulación, Factor Tisular y Plaquetas

El Factor Tisular cofactor del factor VII (FVII) e iniciador de la cascada de coagulación <sup>(28)</sup>, es una glicoproteína transmembrana de 47 kDa, que posee tres dominios, la porción externa sería el sitio de unión para el FVII llevándolo a factor VII activado (FVIIa). El complejo formado entre el FT/FVIIa sería el promotor en el desarrollo de trombosis venosa y arterial <sup>(28)</sup> jugando un

rol crucial en la patología coronaria; se ha visto que esta proteína se encontraría aumentada en la placa arterioesclerótica <sup>(29)</sup>. En base a estos nuevos estudios respecto al FT, se describe una nueva visión de la ya conocida cascada de la coagulación, en esta se pretende dar un papel central a las células, siendo éstas las desencadenantes del proceso <sup>(21)</sup>.

En el nuevo modelo de la coagulación o modelo celular de la coagulación, los procesos o las vías intrínseca y extrínseca se asocian y se producen simultáneamente. El modelo clásico publicado por Macfarlane en 1964 <sup>(25)</sup>, es reformulado debido a las inconsistencias para explicar las causas *in vivo* de las alteraciones y patologías de la coagulación <sup>(30)</sup>. Se ha descrito también que diversas células poseen FT, siendo éste esencial en el proceso de coagulación <sup>(30)</sup>, el modelo desarrollado por Hoffman y cols es actualmente el más aceptado, en este se da un papel fundamental a las células, describiendo también que éstas poseen en su superficie moléculas especiales que dirigen la formación del coágulo <sup>(31)</sup>.

El modelo celular de la coagulación comprende 3 etapas iniciación, amplificación y propagación.

**Iniciación:** El proceso comienza con la unión del FT a su ligando natural el FVII <sup>(25)</sup>, esta asociación hace posible la activación del FVII a FVIIa. En esta etapa se formarán pequeñas cantidades de trombina que actuarán de forma local <sup>(31)</sup>.

**Amplificación:** En esta etapa el daño vascular sufrido favorece el contacto de la membrana plaquetaria con la superficie del endotelio. La trombina generada en la etapa de iniciación activará las plaquetas <sup>(31)</sup>, generando un cambio en la membrana plaquetaria que permitirá el ensamblaje de los factores de la coagulación. La producción de trombina en esta etapa es más eficiente, ya que existe una retroalimentación positiva.

Propagación: El fin de esta etapa es reclutar a más plaquetas circulantes, generar mayor cantidad de trombina y posteriormente una cantidad de fibrina considerable para estabilizar el tapón plaquetario <sup>(31)</sup>.

La participación de plaquetas es central en esta teoría celular de la coagulación debido al aporte de membranas fosfolípicas cargada negativamente que permiten el ensamblaje de los factores de coagulación y su posterior activación. Se ha descrito además la presencia de microvesículas presentes en el plasma que contienen FT <sup>(8)</sup> que sería responsable, en parte, del desencadenamiento de la cascada de coagulación. Se sugiere que estas microvesículas contribuyen de forma relevante en la mantención del estado protrombótico <sup>(8)</sup>. Sin embargo, también se ha descrito que el mayor porcentaje de micropartículas circulantes es de origen plaquetario. La idea que este *blood-borne* FT tenga significancia tanto fisiológica como fisiopatológicamente es controversial <sup>(32)</sup>.

En estudios recientes se ha encontrado que FT estaría presente en plaquetas circulantes ya sea en los gránulos alfa, como también en el sistema canicular abierto <sup>(29)</sup>. En un principio se describió que la presencia de FT en la membrana plaquetaria estaba dada por la transferencia de micropartículas ricas en FT a través de células como los monocitos, polimorfonucleares y macrófagos <sup>(28)</sup>. Por otra parte, se describe que las plaquetas poseen mRNAs de FT proveniente del megacariocito<sup>(33)</sup>, lo cual permitiría la síntesis de esta proteína al ocurrir la activación descartando que sólo sea contaminación leucocitaria <sup>(29)</sup>.

Se ha visto que pacientes diabéticos poseen una concentración mayor de FT en plasma <sup>(34)</sup>, al igual que en placas ateromatosas inestables <sup>(35)</sup>. Dentro de los procesos que dan origen a este aumento, se destacan cambios bioquímicos y estructurales de la membrana plaquetaria las cuales además experimentan una mayor activación plaquetaria, secreción de mediadores de inflamación y de señalización celular. Estudios recientes han concluido que pacientes que han

sufrido eventos cardiovasculares como Síndrome Coronario Agudo, presentan 3 veces más expresión de FT en comparación a pacientes con angina estable y controles sanos, esta medición fue realizada por citometría de flujo en agregados de plaquetas y monocitos circulantes <sup>(9)</sup>.

Frente a estos y otros estudios que relacionan el aumento del FT con el riesgo cardiovascular, sumado a alteraciones plaquetarias y del endotelio vascular en este tipo de pacientes, buscamos estudiar mediante la realización de técnicas como la generación de trombina modificada y actividad procoagulante dependiente de plaquetas (APC-FT) en plaquetas purificadas, en estado basal y estimuladas con agonistas plaquetarios, si la hiperagregabilidad presente en pacientes con DM2 es producto de un aumento en la actividad del FT plaquetario.

## **CAPÍTULO N°2: HIPÓTESIS**

Pacientes con Diabetes Mellitus tipo II, poseen un aumento de la actividad procoagulante dependiente de Factor Tisular plaquetario que favorece el aumento de la hipercoagulabilidad asociada a estos pacientes.

### **CAPÍTULO N°3: OBJETIVO**

Determinar la actividad pro coagulante dependiente de Factor Tisular en plaquetas, marcadores de daño endotelial, inflamación y estrés oxidativo en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II.



## **CAPÍTULO N°4: OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la actividad pro coagulante dependiente de FT plaquetario en plaquetas lavadas por generación de factor X activado (FXa).
- Determinar función plaquetaria (agregación-secreción) a dosis sub-umbrales de agonistas plaquetarios.
- Determinar generación de trombina por técnica modificada en plasma rico en plaquetas (PRP).
- Determinar niveles de marcadores de inflamación, daño endotelial y estrés oxidativo.

## **CAPÍTULO N°5: MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio realizado está enmarcado dentro del Proyecto Fondecyt 1130853, "*CONSTITUTIVE NEO-SYNTHESIS OF PROTEINS BY HUMAN PLATELETS: SOME DISTINCTIVE PATHOPHYSIOLOGICAL FEATURES AND CLINICAL IMPLICATIONS*" del Dr. Diego Mezzano y Proyecto Investigadores Jóvenes Sociedad de Cardiología y Cirugía Vascul ar, del Dr. Luis Quiñiñir.

### **5.1 Tipo de Estudio**

Es un estudio de tipo caso control (clínico).

### **5.2 Lugar de Realización**

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Departamento de Hematología-Oncología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. Cuenta con autorización del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. (Anexo N°1)

### **5.3 Población en Estudio**

Se evaluó a 15 pacientes diagnosticados con diabetes Mellitus tipo II y 15 controles sanos los cuales fueron pareados por sexo y edad.

### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes con DM2 con antecedente previo en tratamiento con hipoglicemiantes orales (HGO) o insulina con HbA1c < 5,7 > a 6,5%.
- Controles se les solicitó HbA1c a su ingreso al protocolo. (< 6,4%)
- Firma consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión:**

- Insuficiencia renal (Clearance de creatinina < 60 mL/min)
- Enfermedades inflamatorias crónicas.
- Infecciones intercurrentes.
- Recuento plaquetario anormal.
- Insuficiencia hepática.
- Diátesis hemorrágica.

## **5.4 Toma de Muestra**

Tanto a los controles sanos como a los pacientes diabéticos, se les realizó una punción venosa periférica con mariposa calibre 19G, con el fin de una adecuada obtención de plaquetas, previa lectura y firma del consentimiento informado. (Anexo 2)

A cada uno se le tomaron 2 tubos con EDTA (tubo lila), 6 tubos con citrato de sodio (tubo celeste), 1 tubo para suero (tubo amarillo) y 1 tubo con Fluoruro de sodio (tubo gris) más 2 jeringas con 2 mL cada una de anticoagulante ACD/Teofilina/prostaglandina (PGE1) preparado por el laboratorio.

## 5.5 Mediciones Bioquímicas y Hematológicas

Las determinaciones realizadas a los pacientes y controles fueron enviadas y posteriormente procesadas en el Laboratorio Clínico central Red Salud UC-Christus.

- Perfil Bioquímico y Lipídico.
- Hemograma y recuento plaquetario.
- Creatinina plasmática.
- Alanino-amino transferasa sérica.
- Creatinina kinasa (CK) sérica.
- HbA1c.

## 5.6 Variable Estudiadas

### 5.6.1 Tiempo de Lisis del Coágulo

Mediante esta técnica se busca evaluar la actividad fibrinolítica del paciente. Corresponde a una modificación de la técnica descrita por Lisman y cols. <sup>(36)</sup>, mediante la incorporación de PRP para evaluar la participación de las plaquetas. El PRP es estimulado con agonistas plaquetarios, como Ristocetina (RIS) (1,2 mg/mL) y TRAP (1  $\mu$ M).

Se registra el cambio de turbidez a 405 nm realizando lecturas cada 55 segundos por 4 horas a 37°C en constante agitación. Esta reacción es medida usando lector de micro-placas Thermo Scientific Multiskan FC, MicroplatePhotometer. El tiempo de lisis del coágulo (TLC) corresponderá al tiempo en que la absorbancia cae al 50% de su valor al momento de formarse el coágulo.

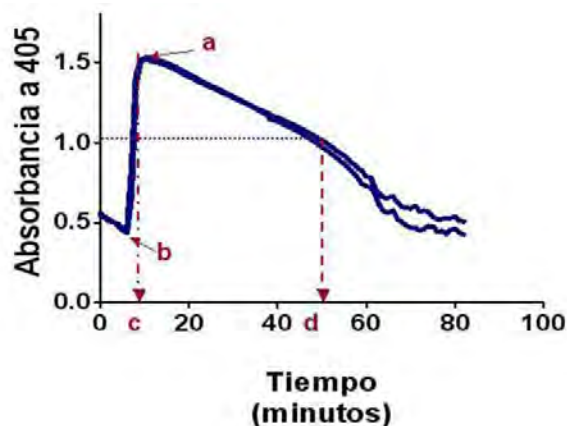


Figura N°1: Curva de formación y lisis del coágulo. Gráfica obtenida del seguimiento de la absorbancia a 405nm (a: máximo de absorbancia, b: absorbancia basal, c: tiempo en que se alcanza el máximo de absorbancia, d: el TLC se calcula mediante el promedio de la resta de la absorbancia máxima (a) menos la absorbancia basal (b). A este resultado luego se le suma la absorbancia basal. El valor obtenido se extrapola en la gráfica obtenida (d), se registra el tiempo en que ocurre esa absorbancia y se resta al tiempo en que se obtuvo la máxima lectura.

### 5.6.2 Agregación

La agregación se realizó en un Agregómetro (BioData PAP-8), se analizan y miden los cambios de Transmitancia en una suspensión de plaquetas estimuladas con diferentes agonistas, la acción de estos agonistas se espera cause su agregación; los parámetros estudiados son área bajo la curva (AUC) y agregación máxima. Este instrumento emite una fuente de luz a 650 nm, la cual incide sobre cada muestra. La agregación plaquetaria antes descrita permite que el paso de la luz incidente a través del PRP (%T) sea mayor.

### 5.6.3 Secreción Plaquetaria

Medición de la secreción o liberación de serotonina intraplaquetaria producto de agregación plaquetaria. Se determina la cantidad de serotonina que permanece en el pellet de plaquetas mediante método de HPLC (High-performance liquid chromatography).

### 5.6.4 Generación de Trombina

La generación de trombina se realizó en un Thrombinoscope® Stago con una versión modificada a la técnica descrita por Hemker *et al.* En la medición se utiliza plasma libre de plaquetas (PLP) fresco y PRP estimulado con RIS (1.2 mg/ml) y TRAP (1 $\mu$ M) en agregómetro previo a la medición, sin incorporar FT exógeno.

Los parámetros a medir fueron los siguientes:

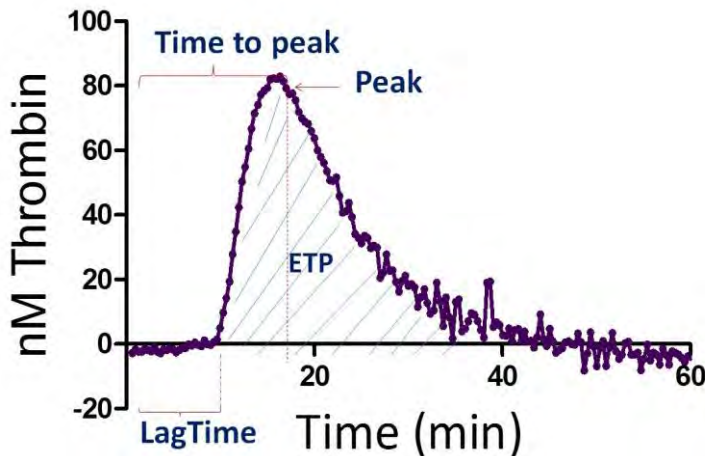


Figura N°2: Parámetros de la técnica generación de trombina.

- Índice de Velocidad ( $V_i$ ):  $\text{peak}/\text{time to peak}-\text{lag time}$ .
- Lag Time: Tiempo que demora en comenzar la generación de trombina.
- ETP: Potencial endógeno de trombina. (Área bajo la curva).
- Peak: Concentración máxima de trombina.
- Time to Peak: Tiempo al peak. (Tiempo que demora en alcanzar el peak).
- Start Tail: Tiempo que comienza la caída a cero.

### **5.6.5 Actividad Pro Coagulante**

La Actividad Pro Coagulante (APC) dependiente de FT plaquetario fue medida en plaquetas lavadas mediante generación de FXa que es determinado por su acción enzimática sobre sustrato cromogénico específico (proporcional a la intensidad del cromógeno producido). Lo que se busca con esto es generar FXa el cual actúa sobre el S22 (sustrato cromogénico, Aniara Corporation, USA) para generar un cromógeno cuya intensidad se analiza en el equipo Multiskan FC microplatephotometer – Thermo Fisher Scientific, el cual es un lector de microplaca de ELISA a 37°C. El software utilizado por el equipo es Skanlt que mide la densidad óptica a 405 nm durante 90 minutos <sup>(32)</sup>.

### **5.6.6 Citometría de Flujo**

Se utilizó el equipo BD ACCURI C6, procesados en el programa C-FLOW SAMPLER con reactivos BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA.

### **5.6.7 Inhibidor plasmático de la fibrinólisis (PAI-1)**

Se determinó mediante Elisa comercial. El protocolo a seguir fue el indicado por el fabricante, HYPHEN Neuville-sur-Oise, Francia.

### **5.6.8 Complejos Trombina/ Antitrombina**

La concentración de complejos Trombina Antitrombina se realizó mediante Elisa comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.6.9 Marcadores de daño oxidativo**

Se utiliza técnica colorimétrica para cuantificar los niveles de productos de oxidación avanzada de proteínas presentes en plasma medidos a una longitud de onda de 340 nm. <sup>(37)</sup>

### **5.6.10 Cuantificación de TNF- $\alpha$ e Interleuquina 6**

Se realizó mediante ELISA comercial, eBioscience Viena, Austria, según instrucciones del fabricante.

### **5.6.11 Proteína C Reactiva**

La cuantificación de PCR en plasma se realizó mediante ELISA. <sup>(38)</sup>

### **5.6.12 Cuantificación de antígeno (FvW:AG) y Prueba de unión a colágeno del FvW**

Técnica ELISA tipo directo para cuantificar los niveles de concentración de FvW y modificada para la prueba de unión a Colágeno (PUC) desarrollado en el Laboratorio de Hemostasia y Trombosis según Siekmann J. *et al* <sup>(39)</sup>.

### **5.6.13 Cuantificación de Fibrinógeno**

Test para la determinación cuantitativa de Fibrinógeno por el método de Clauss, en plasma humano citratado en equipo ACL TOP para los Sistemas de Coagulación IL. Milano, Italia.



#### **5.6.14 Proteína C**

Test cromogénico automatizado para la determinación cuantitativa de la Proteína C en plasma humano citratado en equipo ACL TOP para los Sistemas de Coagulación IL. Milano, Italia.

#### **5.6.15 Antitrombina III**

Test cromogénico automatizado para la determinación cuantitativa de Antitrombina III en plasma humano citratado en equipo ACL TOP para los Sistemas de Coagulación, Aniara, Francia.

## 5.7 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con Software GraphPadPrism 5. Se utilizó prueba t-student, para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos cuando la distribución de datos sea normal y prueba de suma de rangos Wilcoxon, no paramétrica aplicada a dos muestras independientes cuando las muestras no se distribuyan de forma normal. Se consideró como un valor estadísticamente significativo a todo aquel que presentó un  $p < 0,05$ .

Se utilizó análisis descriptivo para evaluar la distribución de las variables en estudio a partir de medidas de dispersión, gráficas y tabla de frecuencia.

## **CAPÍTULO N°6: RESULTADOS**

### **6.1 Características de la población**

En la tabla N°2 se muestran los resultados obtenidos de los participantes en este estudio separados en dos grupos: pacientes diabéticos tipo 2 y grupo de controles sanos, ambos grupos presentan una media de edad de alrededor de los 55 a 56 años.

Se pueden observar diferencias significativas entre ambos grupos tanto en los valores de glicemia como de hemoglobina glicosilada. Mientras que los controles presentan un mayor recuento plaquetario y aumento en los niveles de colesterol total y LDL.

Se describe además que los pacientes diabéticos se encontraban separados por pacientes diabéticos con y sin evento cardiovascular. Además del uso de medicamentos como hipoglicemiantes y estatinas por parte del grupo con DM2.

Por otra parte en ambos grupos no se observa problemas en las pruebas de coagulación y de función renal.

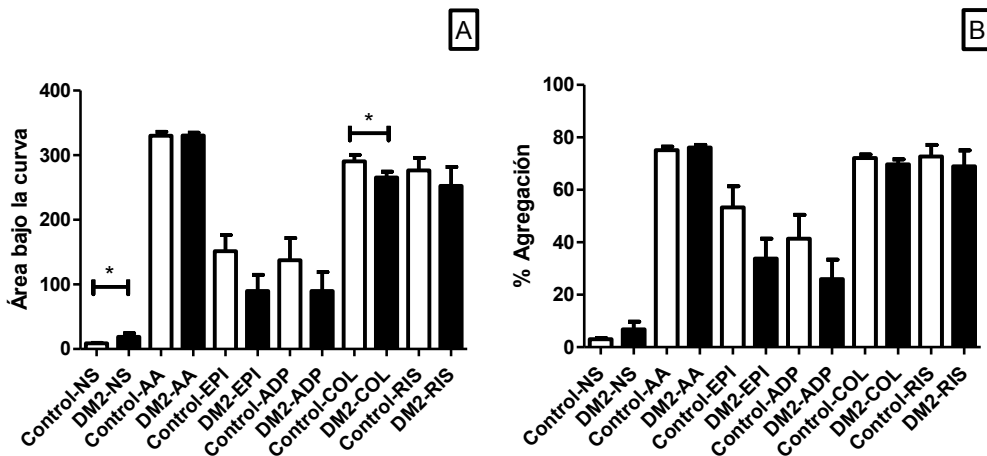
	DM2 (n=15)	Control (n=15)	P <0,05
<b>Genero(M/F)</b>	11/4	11/4	
<b>cEC/sEC</b>	12/3	0/15	
<b>Estatinas (Si/No)</b>	12/3	1/14	
<b>HPO (Si/No)</b>	14/1	0/15	
<b>Insulina (Si/No)</b>	7/8	0/15	
<b>Edad (años)</b>	57,4±6,5 (40-65)	55±5,5 (40-62)	
<b>Cintura (cm)</b>	101,2±6,3	95,8±13,1	NS
<b>IMC(Kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,7±10,2	26,7±2,5	NS
<b>Hematocrito (%)</b>	42,8±3,7	44,4±2,8	NS
<b>R. Plaquetario (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	230,8±48,6	284,5±45,4	*
<b>HbA1c (%)</b>	8,5±2,3	5,7±0,3	**
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	162,2±52,4	96,8±8,6	**
<b>Creatinina(mg/dL)</b>	0,76±0,2	0,80±0,1	NS
<b>CK</b>	136,6±88,1	144,8±101,7	NS
<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	142,9±37,1	212,8±46,7	**
<b>LDL-Colesterol(mg/dL)</b>	71,3±23,3	128,1±41,4	**
<b>HDL-Colesterol(mg/dL)</b>	44,1±9,7	47,8±13,3	NS
<b>TG-Colesterol(mg/dL)</b>	159,4±90,0	184,6±110,6	NS
<b>VLDL- Colesterol(mg/dL)</b>	31,8±17,9	36,8±22,3	NS
<b>PT (s)</b>	10,6±0,5	10,7±0,3	NS
<b>TTPA (s)</b>	28,5±3,1	28,6±3,6	NS

**Tabla N°2:** Características de la población. Se observan los resultados bioquímicos de pacientes diabéticos y controles normales pareados en sexo y edad, cEV: con evento Cardiovascular; sEC: sin evento Cardiovascular HPO: hipoglicemiante oral. Se muestran los promedios ± las desviaciones estándar.

## 6.2 Función plaquetaria

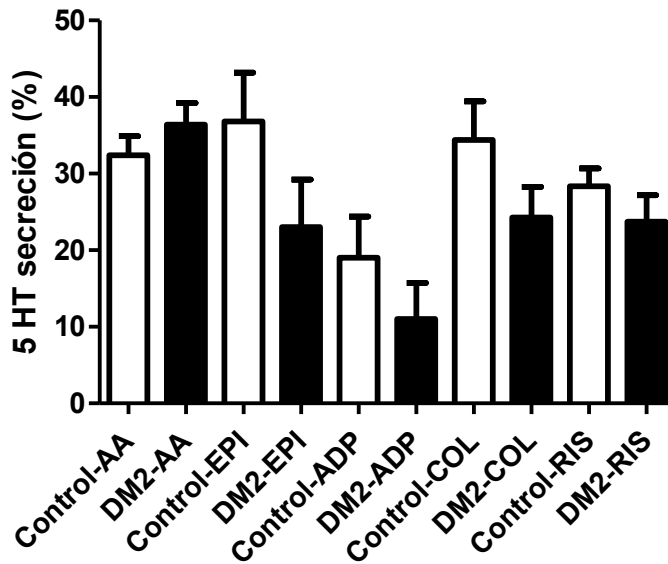
Para evaluar la función plaquetaria se realizaron dos técnicas, la agregación plaquetaria a concentraciones subumbrales de agonistas plaquetarios y luego la secreción de serotonina determinada como porcentaje del contenido inicial de serotonina plaquetaria.

En cuanto a la agregación plaquetaria se evaluó la agregación máxima obtenida en cada muestra y el área bajo la curva de esta agregación. En la Figura N°3, Panel A: se observa una pequeña diferencia cuando se evalúa el área bajo la curva de PRP sin estímulo. Panel B: no hay significancias estadísticas relevantes en cuanto a la agregación máxima.



**Figura N°3:** Agregación plaquetaria con agonistas en concentraciones sub umbrales: Panel A: Área bajo la curva (AUC). Panel B Agregación máxima. NS: Plaquetas no estimuladas. AA: Araquidonato. EPI: Epinefrina. ADP: Adenosin Di Fosfato. COL: Colágeno. RIS: Ristocetina. (\*  $p < 0,05$ ;  $n = 15$ ).

En la Figura N°4 se muestra la secreción de serotonina plaquetaria (5HT) obtenida de cada agregado plaquetario previa estimulación con concentraciones subumbrales de agonistas plaquetarios; No hay diferencias significativas entre ambos grupos.

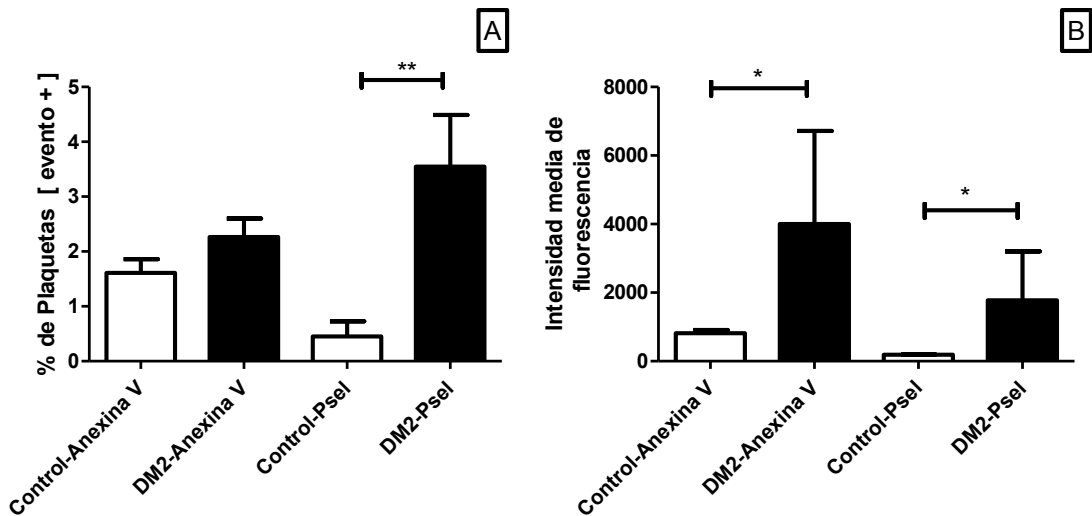


**Figura N° 4:** Porcentaje Secreción plaquetaria de serotonina. AA: Araquidonato. EPI: Epinefrina. ADP: Adenosin Di Fosfato. COL: Colágeno. RIS: Ristocetina. (n=15)

### 6.3 Citometría de flujo

Se evaluó la activación plaquetaria *in vivo*, mediante la determinación de unión de anexina V a fosfatidilserina expuesta en la cara externa de la plaqueta y la expresión sobre la membrana de P-selectina, proteína de gránulos alfa plaquetarios. En el panel A de la Figura N°5 se observa el porcentaje de plaquetas con evento positivo (evento +) ya sea para anexina V o P-selectina, ambos casos comparando el control versus el paciente diabético. En cuanto a la anexina V no se encontró una diferencia significativa entre estos dos grupos, mientras que en la medición de P-selectina sí la hubo entre los controles y los pacientes diabéticos.

Por otra parte en el panel B se observan las mismas variantes de anexina V y P-selectina pero esta es vez se midió la intensidad media de fluorescencia de las muestras. En donde se observa una diferencia significativa entre las variables estudiadas de ambos grupos.

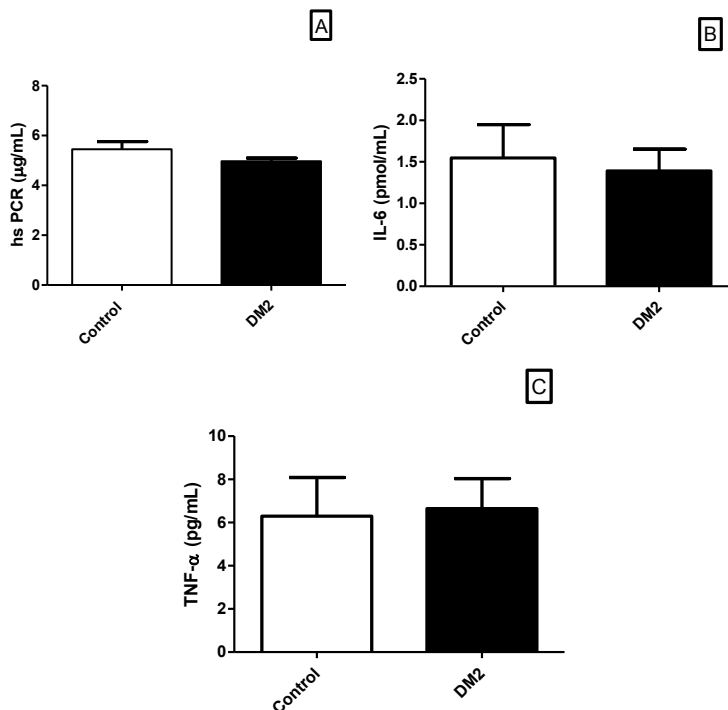


**Figura N°5:** Citometría de Flujo. Panel A: % de plaquetas con evento +. Panel B: Intensidad de fluorescencia de las muestras. (\* $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 15$ )

## 6.4 Marcadores de inflamación y estrés oxidativo

Los pacientes con Diabetes Mellitus II se caracterizan por presentar un estado pro inflamatorio crónico, es por esto que se determinaron los niveles de hsPCR a través de Elisa para concentraciones bajas de PCR (PCR ultrasensible), citoquinas inflamatorias como la IL-6, TNF- $\alpha$  y un marcador de estrés oxidativo como los productos de oxidación de proteínas AOPP.

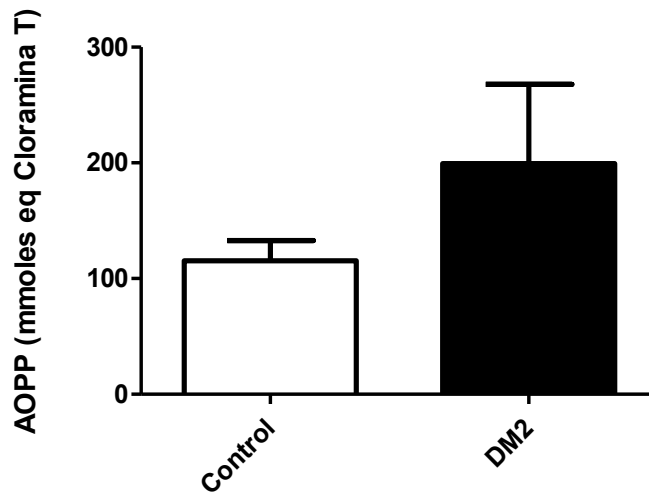
En el Figura N° 6, en los paneles A, B y C, se muestran los resultados obtenidos para las diferentes pruebas. No se encontraron diferencias significativas en PCR ultrasensible (Panel A), concentración de IL-6 (Panel B) o en niveles de TNF- $\alpha$  (Panel C) en los grupos en estudio.



**Figura N°6:** Marcadores de Inflamación. Panel A: Concentración de PCR (Proteína C reactiva). Panel B: Concentración plasmática de Interleuquina 6. IL-6 (Interleuquina 6). Panel C: Concentración de TNF-  $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ). (n=15)



En la Figura N° 7 se muestra el marcador de estrés oxidativo AOPP. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre pacientes con DM2 y controles.

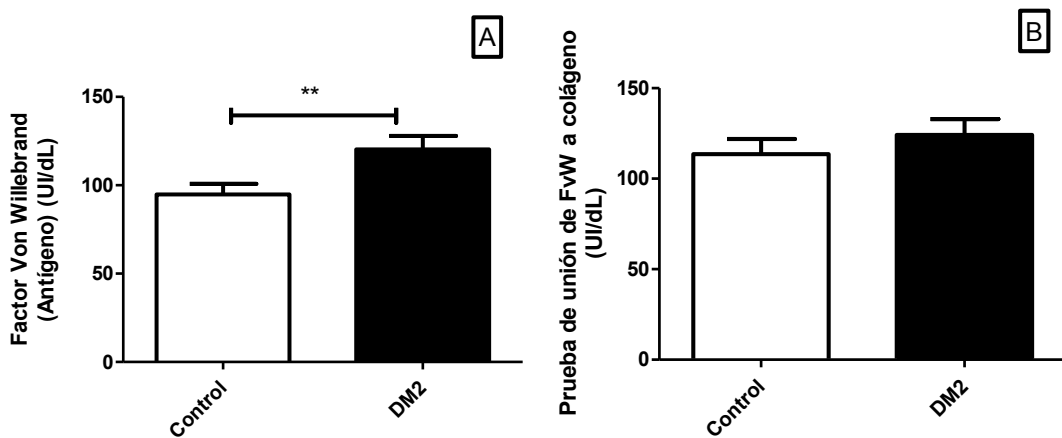


**Figura N°7:** Marcadores de estrés oxidativo: Concentración de AOPP. (n=15)

## 6.5 Marcadores de daño endotelial

Para evaluar el daño endotelial se midió la cantidad de FvW y su funcionalidad mediante la prueba de unión a colágeno (PUC) como se muestra en la Figura N°8.

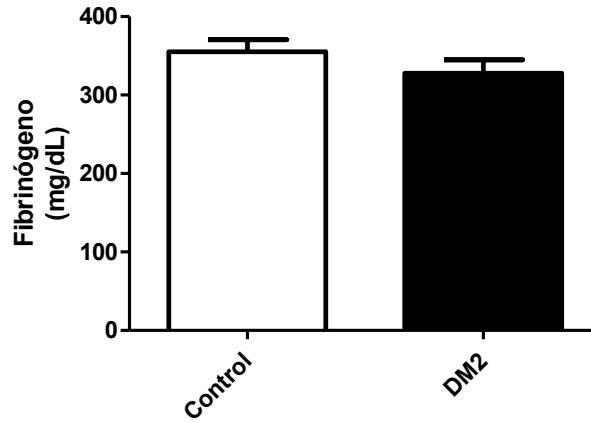
Se observa en el panel A un aumento estadísticamente significativo en los niveles de FvW: Ag en pacientes DM2 con respecto a controles. Por otra parte en el panel B, no se observa diferencia en la actividad del FvW determinada como PUC.



**Figura N°8:** Marcadores de daño endotelial . Panel A: concentración antígeno FvW plasmático. Panel B: Unión de FvW a colágeno (CBA). (\*\* p< 0,01; n=15).

## 6.6 Cuantificación de Fibrinógeno

El fibrinógeno plasmático se midió según el Método de Clauss. No se obtuvo diferencias significativas entre los grupos en estudio.

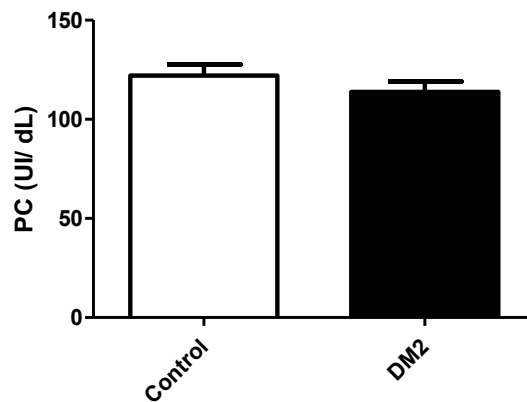


**Figura N°9:** Concentración de Fibrinógeno. Determinada por técnica de Clauss en pacientes DM2 y Controles. (n=15)

## 6.7 Inhibidores de la coagulación

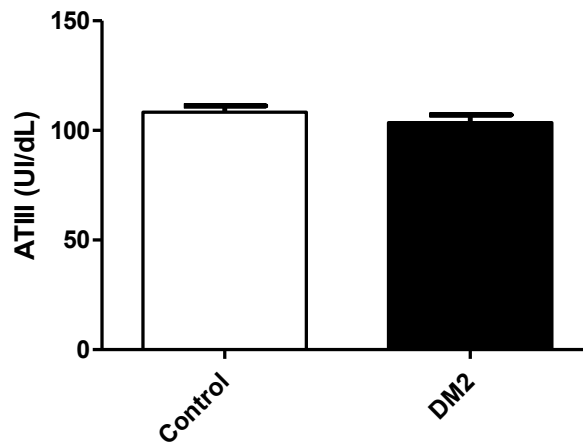
La cascada de coagulación posee inhibidores que permiten frenar este proceso para evitar procesos protrombóticos, este es el caso de la Proteína C, encargada de inhibir al Factor V, VIII y la AT III, encargada de unirse a la trombina e inhibir su acción.

En la Figura N°10 se observa el porcentaje de concentración de la Proteína C, no se obtuvo diferencias de significancia estadística entre los grupos en estudio.



**Figura N°10:** Porcentaje de concentración de Proteína C coagulante. (n=15)

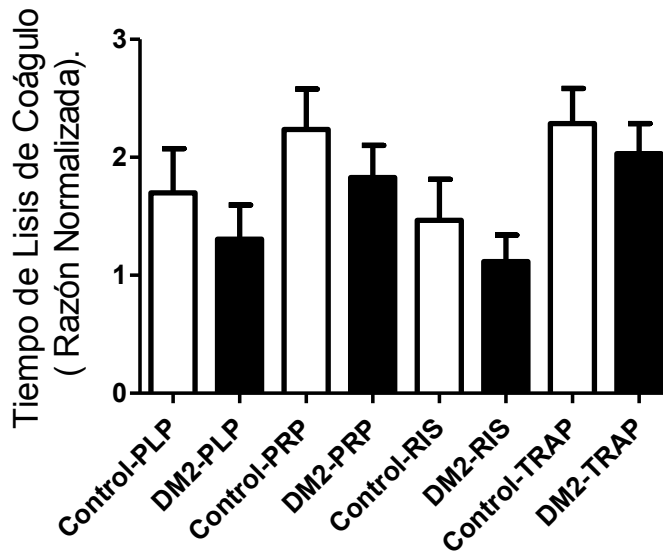
En cuanto al inhibidor AT III, se muestra el porcentaje de concentración plasmática en la Figura N° 11, al igual que la Proteína C no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.



**Figura N°11:** Porcentaje de concentración de AT III plasmática. (n=15)

## 6.8 Actividad fibrinolítica en pacientes con DM tipo II y controles

En la Figura N°12 se muestra los resultados obtenidos para la actividad fibrinolítica en PLP y en PRP estimuladas y no estimuladas con agonistas plaquetarios, con el test global de medición de actividad fibrinolítica, técnica descrita por Lisman *et al* <sup>(40)</sup> y modificada por Panes *et al* <sup>(41)</sup> de los individuos en estudio. No observamos diferencias significativas entre pacientes y el grupo control.



**Figura N° 12:** Tiempo Lisis del Coágulo, en PLP y plaquetas activadas con agonistas plaquetarios. RIS: Ristocetina. TRAP: Péptido activador del receptor de trombina. (n=15)

Se evaluaron las concentraciones del PAI-1 este es el encargado de propiciar la inhibición del Activador del plasminógeno y evitar la degradación de la malla de fibrina dando inicio a la fibrinólisis. En pacientes DM2 se describe un aumento en los niveles de PAI-1, por eso se determinó sus niveles en el grupo en estudio. Se observa en la Figura N°13 que las concentraciones de esta variable no muestran diferencias entre el grupo control y el de pacientes con DM tipo II.

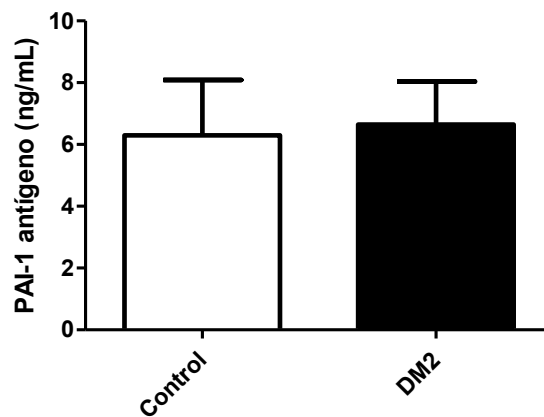
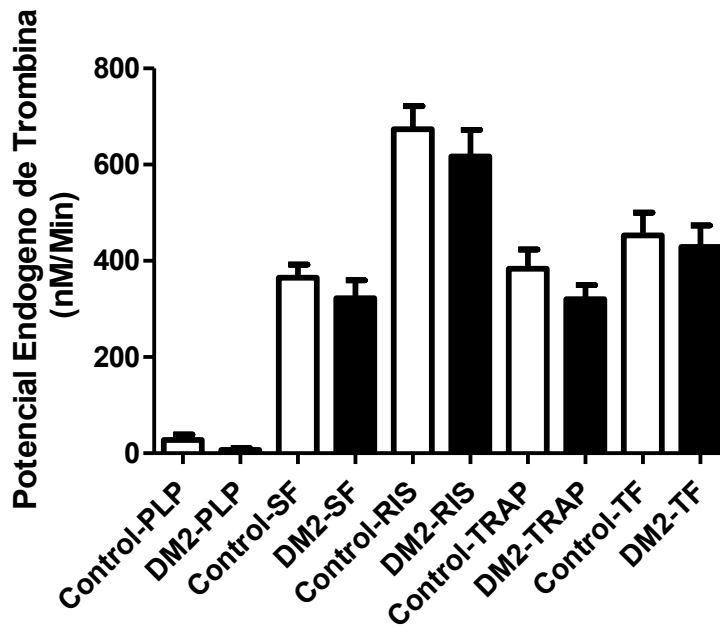


Figura N°13: Concentraciones del PAI-1. (n=15)

## 6.9 Generación de trombina *ex vivo* e *in vivo*

Para determinar si existe en estos pacientes un aumento se evaluó la generación *ex vivo* de trombina. Para esto se realizó una prueba en la cual se midió la generación de esta en PRP sin estimular (SF) estimulado con RIS y TRAP. Se analizaron tres parámetros entregados por la técnica de Generación de trombina automatizado (CAT): ETP, PEAK y el Vi. Para mantener la fidelidad de la técnica y de los reactivos utilizados se utilizó un pool normal en cada ensayo con el fin de estandarizar y validar los resultados obtenidos.

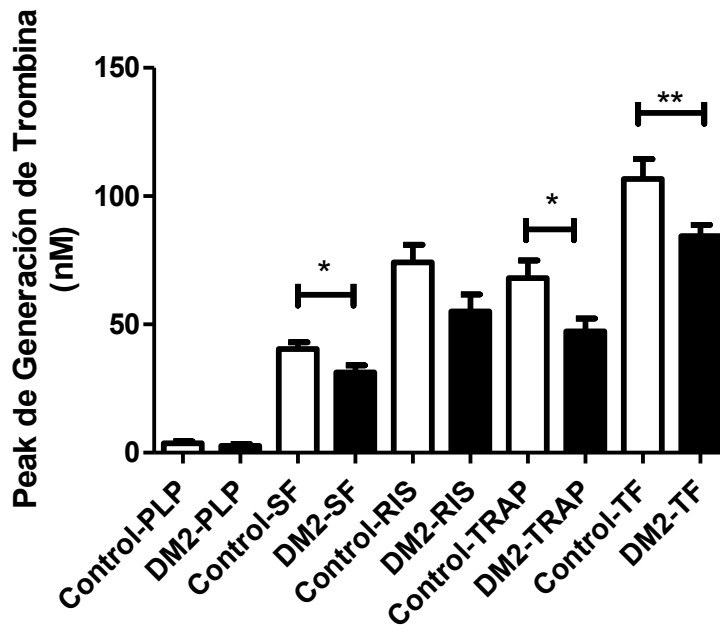
El análisis del ETP no resultó ser estadísticamente diferente entre pacientes DM2 y controles (Figura N°14).



**Figura N°14:** Generación de trombina; Potencial endógeno de producir trombina (ETP). SF: No estimuladas. RIS: Ristocetina. TRAP: Péptido análogo del receptor de trombina. FT: plasma libre de plaquetas con Factor Tisular 5pM. (n=15)

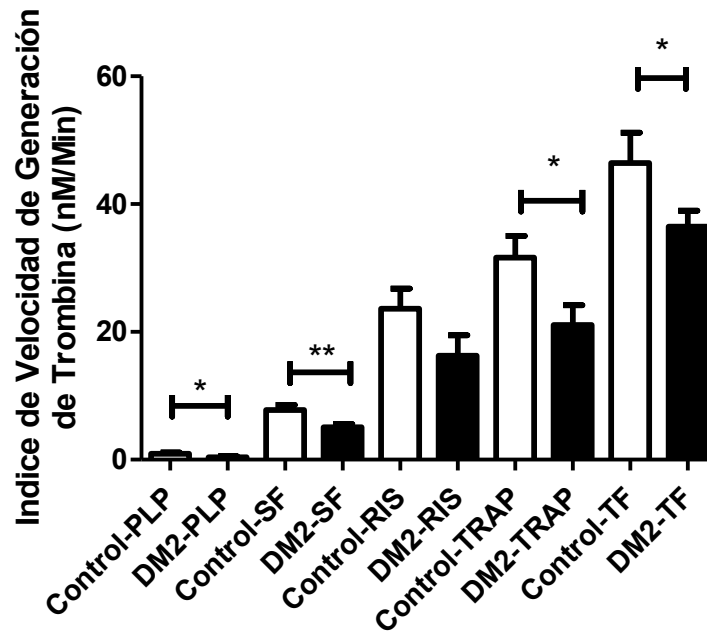


La determinación del Peak alcanzado, se observó una disminución significativa en los pacientes con DM2 en relación al grupo control, tanto en las plaquetas estimuladas con TRAP, como en el PLP al cual se le añadió Factor Tisular con el fin de propiciar la generación de trombina en una suspensión libre de plaquetas (Figura N°15).



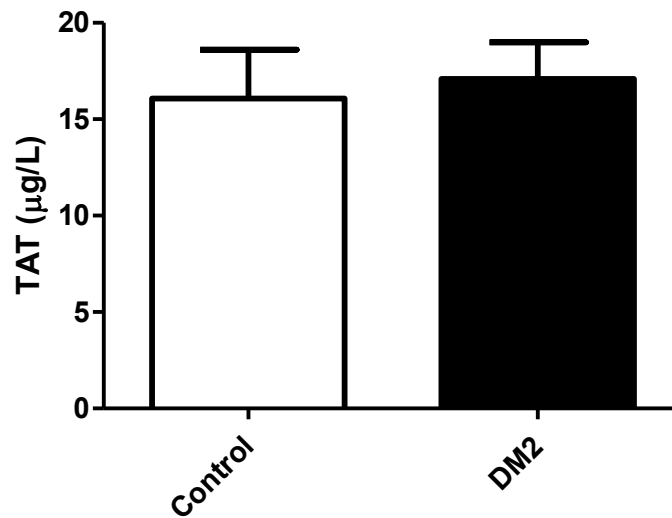
**Figura N°15:** Generación de trombina; PEAK: Máxima generación de trombina. SF: Suero Fisiológico. RIS: Ristocetina. TRAP: Péptido análogo del receptor de trombina. FT: Factor Tisular (5pM). Plaquetas estimuladas y no estimuladas. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 15$ ).

Finalmente se observa una disminución estadísticamente significativa en el Vi de la generación de trombina en los pacientes con DM2 versus su controles sanos. (Figura N°16)



**Figura N°16:** Índice de velocidad de generación de trombina, SF: PRP no estimulado; RIS: estimulado con Ristocetina. TRAP: estimulado con TRAP; FT: PLP con TF 5pM. (\*p<0,05; \*\*p<0,01; n=15).

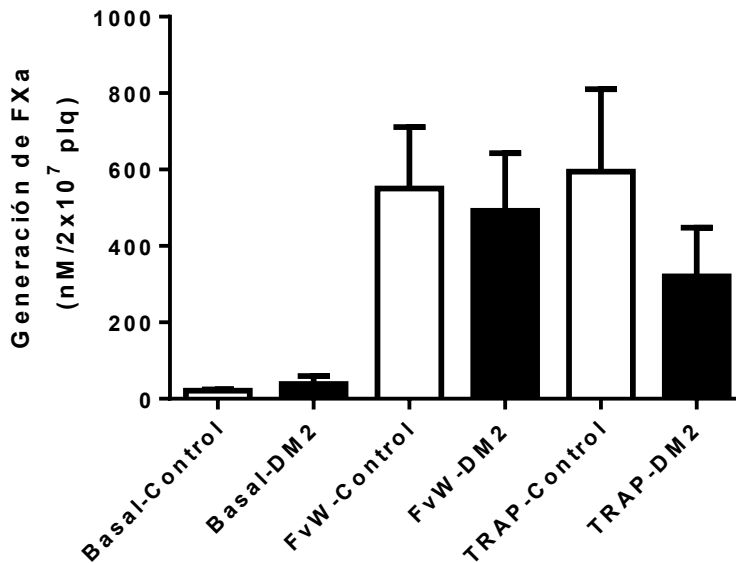
En cuanto a la Generación de trombina *in vivo* fue medida mediante la formación de complejos trombina-antitrombina. En la Figura N° 17, se aprecia la concentración de estos complejos tanto en pacientes con DM2 y de grupo control. No hubo diferencias significativas.



**Figura N°17:** Concentración de complejos trombina-antitrombina. TAT: Trombina-Antitrombina. (n=15)

## 6.10 APC-FT

La APC-TF, se midió en plaquetas lavadas en condiciones Basales o no estimuladas, estimuladas con FvW más RIS y en plaquetas estimuladas con TRAP. Se observa la Figura N°18 los resultados de los controles y de pacientes diabéticos. No se encontró diferencias significativas en ninguno de las tres condiciones en que se realizó el estudio.



**Figura N°18:** Actividad procoagulante dependiente de FT Plaquetario. Generación de FXa en plaquetas no estimuladas (Basal), estimuladas con FvW (1IU/mL) más Ristocetina (1,2 mg/mL) (FvW) o estimuladas con TRAP 10 µM. (n=15).

## CAPÍTULO N°7: DISCUSIÓN

En esta unidad de investigación quisimos estudiar pacientes con DM tipo II, quienes presentan un estado protrombotico aumentado, el que se asocia a una alta prevalencia de enfermedad cardiovascular y causa de muerte. En este tipo de pacientes existe un aumento en la actividad de FT plaquetario.

Para esto reclutamos pacientes con DM tipo II y controles que se declararon sanos, a los cuales se procedió a determinar diferentes marcadores de activación plaquetaria, daño endotelial, marcadores de inflamación, marcadores de generación de trombina *in vivo* y actividad de FT plaquetario *ex vivo* mediante Generación de Trombina y APC-TF en plaquetas lavadas.

Sabemos que la población chilena tiene un alto índice de obesidad en la población adulta y se desconoce el número real de diabéticos por falta de control. Tras analizar los exámenes bioquímicos de nuestra población control pareada por sexo y edad con nuestro grupo de estudio, encontramos que la gran mayoría de nuestros controles se encuentran en el rango de pre-diabéticos debido a que a pesar de poseer glicemias normales su hemoglobina glicosilada mostró niveles superiores al rango considerado como normal (menor de 5,5 %).

Los pacientes diabéticos reclutados presentaron valores de glicemia y hemoglobina glicosilada elevados propios de esta enfermedad, dentro del rango esperado para pacientes en control glicémico, ya que incluyó a aquellos que estaban con tratamiento hipoglicemiante y/o con Insulina para determinar si el tratamiento estaba influyendo en la APC-FT plaquetaria.

No pudimos confirmar el aumento de marcadores inflamatorios daño endotelial, estrés oxidativo e hiperactividad plaquetaria en pacientes con DM tipo 2 <sup>(10,11,14)</sup>, descrito por otros autores, probablemente debido a la influencia también de las estatinas, que se sabe disminuyen la función plaquetaria y los marcadores de inflamación en pacientes hipercolesterolémicos <sup>(42)</sup>.

Por otro lado, si bien es cierto los niveles de daño presentes en pacientes con hipercolesterolemia no disminuyen a los niveles normales, presentando una leve elevación, la utilización de un grupo control, que según datos de laboratorio, podrían catalogarse como pre-diabéticos, podría dar cuenta de la ausencia de diferencias observadas en nuestros análisis estadísticos de los datos obtenidos.

Si bien, no se encontraron diferencias significativas, no podemos descartar que nuestro grupo de pacientes no se encuentra en con algún tipo de daño o inflamación, ya que el grupo control presenta valores elevados de estos en comparación a los valores de referencia establecidos por el laboratorio en estudios anteriores.

Encontramos que los pacientes diabéticos *in vivo* sí poseen una activación plaquetaria dada por el aumento de exposición de P-selectina, la que no se ve reflejada en las pruebas *ex vivo*, debido probablemente a que podrían encontrarse refractarias a una activación *ex vivo*.

Si bien se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos en cuanto a la activación plaquetaria *in vivo*, esta activación probablemente estaría dada el de daño endotelial de estos pacientes, ya que presentaron valores aumentados de FvW con respecto a los controles.

El aumento de FvW plasmático sería reflejo de activación o daño de células endoteliales, que sería suficiente para activar *in vivo* las plaquetas, sin embargo, esta activación resultaría en plaquetas anérgicas a una activación *ex*

vivo lo que explicaría la disminución en la función plaquetaria y en generación de trombina.

En cuanto al tema central de nuestra investigación, la actividad procoagulante dependiente de factor tisular plaquetario (APC-FT), no encontramos diferencias significativas con respecto al grupo control, dado probablemente por el uso de estatinas en la mayoría de los pacientes DM2 reclutados.

Estudios realizados en el laboratorio de Hemostasia y Trombosis de la Pontificia Universidad Católica de Chile, han mostrado que el uso de estatinas (Atorvastatina y Rosuvastatina) <sup>(42)</sup> disminuye la APC-TF, aunque no a los niveles de controles normales.

Se ha descrito además que altos niveles de colesterol en especial de *Low Density Lipoprotein* (LDL) se acompañan de una aumentada actividad procoagulante <sup>(43)</sup>. Los controles estudiados tienen un nivel aumentado de colesterol total y colesterol LDL, lo que podría explicar en cierto modo porque nuestros grupos no poseen diferencias significativas.

Estudios han encontrado además que efectos en el control de hiperglicemia o de hiperinsulinemia afectan la APC-FT, este estudio fue realizado en lisados de membrana de sangre total y se observan diferencias significativas entre pacientes controlados y no controlados. Los resultados <sup>(44)</sup> demuestran que pacientes no controlados poseen mayor actividad procoagulante en comparación a pacientes normo-glicémicos e hiperinsulinemicos y normo-glicémicos, normo-insulinemicos.

Por tanto para responder en forma correcta la hipótesis de este trabajo, proponemos reclutar pacientes DM2 sin uso de estatinas o controlar estos mismos pacientes sin el uso de estas y tomar una nueva muestra realizando un estudio para determinar si la glicemia es el factor independiente de riesgo cardiovascular o la hipercolesterolemia.

Otra posibilidad es reclutar pacientes diagnosticados con DM tipo II, previo a todo tratamiento y hacer un seguimiento post-tratamiento con hipoglicemiante.

Cambio o restricción en el nivel de hemoglobina glicosilada, utilizado para considerar el grupo control.

Además, proponemos aumentar el número de pacientes con DM2 y controles reclutados, para aumentar la confianza de los test estadísticos utilizados.



## **CAPÍTULO N°8: CONCLUSIÓN**

- No se encontró aumento de la actividad pro coagulante dependiente de factor tisular en plaquetas de pacientes diabéticos controlados en comparación a nuestro grupo control.
- El buen manejo de los pacientes diabéticos con hipoglicemiantes orales y estatinas, disminuye los niveles de los factores de riesgo tradicional de hipecoagulabilidad, lo que podría traducirse en un menor riesgo de sufrir eventos cardiovasculares en estos pacientes.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. King, H. (1999). WHO and the International Diabetes Federation: regional partners. *Bulletin of the World Health Organization: the International Journal of Public Health*; 77(12), 954.
2. American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 33(Supplement 1), S62-S69.
3. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG., Valle T, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Uusitupa, M. (2001). Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *New England Journal of Medicine*, 344(18), 1343-1350.
4. World Health Organization. (1994). Prevention of diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. Geneva: World Health Organization; No. 844.
5. Carr, ME. (2001). Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *Journal of Diabetes and its Complications*, 15(1), 44-54.
6. Pineda M S, Nadal J F, Ellacuria M P, Zerbe C O, Bartomeu J G, García J C. (2001). Estadísticas y causas de mortalidad en la diabetes tipo 2. *Atención Primaria*, 27(9), 654-657.
7. Jakob, A H. (2008). Effects of Intensive Glucose Lowering in Type 2 Diabetes. *MedizinischeKlinik*, 103(11), 807-807.
8. Brambilla M, Camera M, Colnago D, Marenzi G, De Metrio M, Giesen PL, Balduino A, Veglia F, Gertow K, Biglioli P, Tremoli E. (2008). Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: Expression in platelets, leukocytes, and platelet-leukocyte

aggregates. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.28,947–953.

9. Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Engelmann B. (2003). Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J*, 17(3), 476-478.
10. Primarios, E. D. H, de Antitrbmina III, déficit. (1997). Estados de hipercoagulabilidad. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 13(2), 90-108.
11. Lena A, Raymondo S. (2007). Evaluación de inhibidores fisiológicos de la coagulación en pacientes diabéticos tipo 2. *Acta Bioquímica clínica latinoamericana*, 41(2), 213-218.
12. Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP, Lowe GD, Small M. (1992) Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes*. 41,909–913.
13. McGill JB, Schneider DJ, Arfken CL, Lucore CL, Sobel BE. (1994) Factors responsible for impaired fibrinolysis in obese subjects and NIDDM patients *Diabetes* 43,104–109.
14. Yngen, M. (2005). Platelet hyperactivity in diabetes mellitus.
15. González Quintana X, Notario Rodríguez, M, Guzmán Sabo A. (2001). Las plaquetas en la diabetes mellitus. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 17(1), 19-24.
16. Matadamas-Zárate C, Hernández-Jerónimo J, Pérez-Campos E, Majluf-Cruz A. (2009). Platelet abnormalities in type 2 diabetes mellitus. *Archivos de Cardiología de Mexico*, 79, 102-108.
17. Creager A, Lüscher F, Cosentino F, Beckman A. (2003). Diabetes and vascular disease pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Circulation*, 108(13).

18. Ferreira IA, Mocking AI, Feijge MA, Gorter G, van Haeften TW, Heemskerk J W, Akkerman J W N. (2006). Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(2), 417-422.
19. Caunedo. (2005) "Alteraciones de la hemostasia en la diabetes mellitus." *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 21.1.
20. Fitó Colomer M. (2003). Efecto antioxidante del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos. (Tesis doctoral). Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Universidad Autónoma de Barcelona.
21. Cruz Hernández J, Licea Puig ME, Hernández García P, Yanes Quesada M, Salvato Dueñas A. (2012). Disfunción endotelial y diabetes mellitus. *Revista Cubana de Endocrinología*, 23(2), 166-185.
22. Iván Palomo G, Jaime Pereira G, Julia Palma B. (2009). *Hematología, Fisiopatología y Diagnóstico*. Talca- Chile: Universidad de Talca. (pag.460-466).
23. Weyrich A S, Lindemann S, Zimmerman GA. (2003). The evolving role of platelets in inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1(9), 1897-1905.
24. Semple, J W, Italiano J E, Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology*, 11(4), 264-274.
25. José Henry Osorioz, Yocner Edilson Quenán, Wilmer Borja Gómez. (2013). Evolución y cambios en el sistema de la coagulación sanguínea: Una reflexión.


- 26.** Pelusa HF, de los Ángeles Valdés M, Bearzotti M, Svetaz M J, Daniele S M, Sjoberg I, Arriaga, S. (2012). Anticuerpos anti-anexina V y otros marcadores de actividad antifosfolipídica en mujeres abortadoras recurrentes con enfermedades autoinmunes. *Rev. argent. reumatol*, 23(2), 16-24.
- 27.** Valdés Rodríguez YC, Bilbao Díaz M, León Álvarez JL, Merchán González F. (2002). Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *Revista Cubana de Farmacia*, 36(2), 121-128.
- 28.** Albaladejo GE, López-Vílchez I, Díaz-Ricart M, Silvo A M G. Interacción entre las plaquetas y el Factor Tisular: Mecanismos e implicaciones Patológicas.
- 29.** Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell DC, Tremoli E. (2003). Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(9), 1690-1696.
- 30.** Fernández JAP, Panizo E, Pegenaute C, Villamediana RL. (2009). Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Revista de Medicina*, 53 (1), 19-23.
- 31.** Gómez Baute R, Guerra Alfonso T, Dita Salabert L, Fernández Águila J, Cabrera Zamora M. (2011). Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares. *Medisur*, 9(2), 146-155.
- 32.** Panes O, Matus V, Sáez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. (2007). Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood*, 109(12), 5242-5250.

33. Brambilla M, Facchinetti L, Canzano P, Rossetti L, Ferri N, Balduini A, Camera M. (2015). Human megakaryocytes confer tissue factor to a subset of shed platelets to stimulate thrombin generation. *Thromb Haemostacy*.
34. Lim HS, Blann AD, Lip GY (2004). Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *109*: 2524–2528.
35. AC van der Wal, Li X and OJ de Boer. (2006). Tissue factor expression in the morphologic spectrum of vulnerable atherosclerotic plaques, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 32, 40–47.
36. Panes O, Padilla O, Matus V, Sáez C G, Berkovits A, Pereira J, Mezzano D. (2012). Clot lysis time in platelet-rich plasma: Method assessment, comparison with assays in platelet-free and platelet-poor plasmas, and response to tranexamic acid. *Platelets*, 23(1), 36-44.
37. Kalousova M, Skrha J, Zima T. (2002). Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res*, 51, 597-604.
38. Macy E, Hayes T, Tracy RP. (1997). Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clinical Chemistry*; 43(1):52-58.
39. Siekmann J, Turecek PL, Schwarz HP. (1998). The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. *Haemophilia*, 4, Suppl 3:15-24.
40. Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR. (2005). Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood*, 105 (3), 1102-1105.


41. Panes O, Padilla O, Matus V, Sáez CG, Berkovits A, Pereira J, Mezzano D. (2012). Clot lysis time in platelet-rich plasma: Method assessment, comparison with assays in platelet-free and platelet-poor plasmas, and response to tranexamic acid. *Platelets*, 23 (1), 36-44.
42. Olga Panes, Gustavo Soto, Cesar González, Valeria Matus, Claudia Sáez, Jaime Pereira and Diego Mezzano.(2014). Tissue factor-dependent pro-coagulant activity of human platelets is directly related to membrane cholesterol content. Rosuvastatin, But Not Atorvastatin, Reduces The Platelet Cholesterol, Tissue Factor. 56 th ASH meeting San Diego, USA. *Blood Journal*.
43. Korporaal S J, Akkerman J W. (2006). Platelet activation by low density lipoprotein and high density lipoprotein. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 35(3-4), 270-280.
44. Vaidyula VR, Rao AK, Mozzoli M, Homko C, Cheung P, Boden G. (2006). Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on circulating tissue factor procoagulant activity and platelet CD40 ligand. *Diabetes*, 55(1), 202-208.

## ANEXOS

### Anexo N°1: Aprobación del Comité de Ética.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
SCHOOL OF MEDICINE  
COMITÉ ETICO-CIENTIFICO F.C. MEDICINA



Santiago, 18 de diciembre de 2014

**SE APROBÓ EL SIGUIENTE PROYECTO**

Número Proyecto: **14-516**

**Investigador Responsable:** Quiñir, Luis  
Departamento de Enfermedades Cardiovasculares

**Financiamiento:** Fondecyt de Dr. Corbalán y de Dr. Mezzano

**Título PROYECTO:** Actividad pro coagulante del factor tisular plaquetario en pacientes con diabetes mellitus.

**Se acusa recibo de los siguientes documentos:**  
Carta del investigador responsable solicitando la revisión y aprobación de nuevo estudio en referencia.  
Carta de respaldo del Jefe de Departamento, Dr. Eduardo Guarda.



**Documentos revisados y aprobados por el comité:**  
Protocolo de Investigación  
Documento de consentimiento informado, primera versión, noviembre de 2014  
Encuesta para ingreso de pacientes al protocolo.

**Resolución del CEC Med UC:**  
Este proyecto ha sido aprobado con fecha 18 de diciembre de 2014 y tiene vigencia de un año. A contar del 17 de diciembre de 2015 el investigador responsable deberá solicitar al Comité de Ética la renovación anual del estudio si desea continuar con él.

Por favor lea cuidadosamente la hoja anexa a esta carta en la que se indican todas sus responsabilidades como investigador responsable de este estudio.

Se le solicita en toda futura correspondencia hacer referencia al número del Proyecto asignado **14-516**

Le saluda atentamente,



**DRA. BEATRIZ SHAND KLAGGES**  
Presidente CEC-MedUC

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC Med UC

Se certifica que la información contenida en el presente documento es correcta y que refleja el acta del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina (CEC-MedUC). Este Comité adhiere a los principios éticos de Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica, que considera como norma fundamental el respeto a la dignidad de la persona humana en cualquier condición, desde el momento de la concepción hasta la muerte natural. Este Comité también promueve las guías de buena práctica clínica definidas por la conferencia internacional de armonización (GCP-ICH) y con las leyes Chilevas 120 y 19.628 sobre protección de la vida privada o protección de datos de carácter personal.



## Anexo N°2:

### Consentimiento informado pacientes con y sin eventos cardiovasculares y controles sanos.

3

#### DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Pacientes con Diabetes Mellitus 2 con eventos Cardiovasculares

**Nombre del Estudio:** Actividad pro coagulante del factor tisular plaquetario en pacientes con diabetes mellitus

**Sigla Protocolo:** (FT-DM)

**Patrocinador del Estudio / Fuente Financiamiento:** Departamento de Enfermedades Cardiovasculares, Pontificia Universidad Católica de Chile  
Departamento de Hematología y Oncología

**Investigador Responsable:** Dr. Luis Quiñifir Salvatici (09-61400056)  
Dr. Ramón Corbalán / Dr. Diego Mezzano



El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar, -o no-, en una investigación médica.

Tome el tiempo que requiera para decidirse, lea cuidadosamente este documento y hágale las preguntas que desee al médico o al personal del estudio que en este momento se encuentra junto a Ud.

Este estudio está siendo financiado a través de fondos asignados por el Departamento de Enfermedades Cardiovasculares de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile a sus becados en formación.

#### OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Las plaquetas son células de la sangre que tienen un rol muy importante en la coagulación. Las plaquetas pueden fabricar una molécula llamada Factor Tisular, el cual podría tener un rol en los procesos de formación de trombos en las arterias coronarias o cerebrales, lo que es más frecuente en pacientes diabéticos.

El propósito de este estudio es determinar si existen diferencias en la actividad de una proteína llamada Factor Tisular producida por las plaquetas y comparar diferencias en pacientes Diabéticos con enfermedad cardiovascular, Diabéticos sin enfermedad cardiovascular y en pacientes sin historia de enfermedad.

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque es un paciente **diabético que ha tenido enfermedad cardiovascular**, como un infarto agudo al miocardio. En este caso usted servirá para comparar esta función de las plaquetas con sujetos que no han tenido enfermedad cardiovascular.

#### PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

- En el consultorio o en el Hospital se le explicará la investigación y – si desea participar en este – deberá firmar este documento de consentimiento.



Pontificia Universidad Católica de Chile

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN  
ESTUDIO CLÍNICO Noviembre 2014.

- Será citado una mañana al Centro de Investigación Clínica de la Universidad Católica (CICUC)
- Debe asistir en ayuno, no puede consumir alimentos 8 horas antes del control. Puede tomar agua y debe continuar consumiendo todos sus medicamentos, excepto la aspirina.
- Si usted usa Aspirina esta debe ser suspendida 5 días antes del control
- Será evaluado por un Médico residente de Cardiología, quien revisará sus antecedentes clínicos.
- Mediante una punción venosa se extraerán 40cc de sangre por única vez (2/3 de taza chica de café)
- La extracción de las muestras de sangre es igual que para cualquier examen de laboratorio clínico, el procedimiento demora alrededor de 10 minutos
- Se le dará un desayuno posterior a la toma del examen
- Se le entregará ayuda financiera para asistir a este control (\$2000 pesos)
- Sus muestras de sangre no se utilizarán para estudios genéticos
- Sus muestras de sangre no se usarán en estudios posteriores, y si, por alguna razón fuera necesario hacer otras determinaciones, le solicitaremos un nuevo consentimiento.
- Las muestras ya utilizadas serán eliminadas de inmediato o se conservan hasta el fin del proyecto de investigación. Sus muestras de sangre estarán bajo la custodia del Dr. Diego Mezzano, en el laboratorio de hemostasia y trombosis UC.
- Los resultados obtenidos en el estudio de su sangre le serán informados a Ud. personalmente si así lo requiere o al médico que Ud. designe.

#### BENEFICIOS

Usted no tendrá beneficios por participar este estudio. Sin embargo, la información que se obtendrá será de utilidad para conocer más acerca del funcionamiento de las plaquetas en pacientes diabéticos eventualmente podría beneficiar a otras personas con su misma condición más adelante.

#### RIESGOS

Los únicos riesgos son los relacionados con la punción venosa, pudiese experimentar dolor, aparición de equimosis (moretón) y muy rara vez infección en el sitio de punción.

#### COSTOS

Los costos derivados por su participación en este estudio no recaerán, bajo ninguna circunstancia en Ud. Este estudio no cubre los costos asociados al manejo médico habitual de su condición de salud actual.

#### CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN

La información obtenida se resguardará de forma confidencial y anónima. Su nombre al momento del análisis de los datos, será reemplazado por un código. La información clínica de Ud. ingresará a una base de datos común para su análisis posterior.

Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su nombre jamás será conocido por la comunidad.

#### VOLUNTARIEDAD

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria.



Pontificia Universidad Católica de Chile

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN  
ESTUDIO CLÍNICO Noviembre 2014.

Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento y retirarse de esta investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución y no se verá afectada la calidad de la atención médica que merece.

Si usted retira su consentimiento, sus muestras de sangre, serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.

**PREGUNTAS**

Si tiene preguntas acerca de esta investigación médica puede contactar o llamar al Dr. Luis Quiñiñir, Investigador Responsable del estudio, al teléfono celular 9-61400056, lquininir@uc.cl

Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede llamar a la Dra. Beatriz Shand Klagges, Presidente del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, al teléfono 2354-8173, o enviar un correo electrónico a: [etica.investigacion@med.puc.cl](mailto:etica.investigacion@med.puc.cl)

**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**

- Se me ha explicado el propósito de esta investigación médica, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee.
- Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado o forzada a hacerlo.
- No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.
- Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación esta investigación médica según mi parecer y en cualquier momento que lo desee.
- Yo autorizo al investigador responsable y sus colaboradores a acceder y usar los datos contenidos en mi ficha clínica para los propósitos de esta investigación médica.
- Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

**FIRMAS**

• Participante: Nombre \_\_\_\_\_

Firma y fecha \_\_\_\_\_

• Investigador: Nombre \_\_\_\_\_

Firma y fecha \_\_\_\_\_

• Director de la institución o su Delegado:

Nombre \_\_\_\_\_

Firma y fecha \_\_\_\_\_



Pontificia Universidad Católica de Chile

**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN ESTUDIO CLÍNICO Noviembre 2014.**

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**Controles Sanos**

**Nombre del Estudio:** Actividad pro coagulante del factor tisular plaquetario en pacientes con diabetes mellitus

**Sigla Protocolo:** (FT-DM)

**Patrocinador del Estudio / Fuente Financiamiento:** Departamento de Enfermedades Cardiovasculares, Pontificia Universidad Católica de Chile  
Departamento de Hematología y Oncología

**Investigador Responsable:** Dr. Luis Quiñifir Salvatici (09-61400056)  
Dr. Ramón Corbalan / Dr. Diego Mezzano



El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar, -o no-, en una investigación médica.

Tome el tiempo que requiera para decidirse, lea cuidadosamente este documento y hágale las preguntas que desee al médico o al personal del estudio que en este momento se encuentra junto a Ud.

Este estudio está siendo financiado a través de fondos asignados por el Departamento de Enfermedades Cardiovasculares de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile a sus becados en formación.

**OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

Las plaquetas son células de la sangre que tienen un rol muy importante en la coagulación. Las plaquetas pueden fabricar una molécula llamada Factor Tisular, el cual podría tener un rol en los procesos de formación de trombos en las arterias coronarias o cerebrales, lo que es más frecuente en pacientes diabéticos.

El propósito de este estudio es determinar si existen diferencias en la actividad de una proteína llamada Factor Tisular producida por las plaquetas y comparar diferencias en pacientes Diabéticos con enfermedad cardiovascular, Diabéticos sin enfermedad cardiovascular y en pacientes sin historia de enfermedad.

Usted ha sido invitado a participar en este estudio porque se considera una persona sana y acepta participar voluntariamente en el proyecto arriba enunciado como **control sano**. En este caso usted servirá como un individuo sano para comparar esta función de las plaquetas con enfermos que tienen Diabetes Mellitus.

**PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN**

- En el consultorio o en el Hospital se le explicará la investigación y – si desea participar en este – deberá firmar este documento de consentimiento.



Pontificia Universidad Católica de Chile

**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN ESTUDIO CLÍNICO Noviembre 2014.**

- Será citado una mañana al Centro de Investigación Clínica de la Universidad Católica (CICUC)
- Debe asistir en ayuno, no puede consumir alimentos 8 horas antes del control. Puede tomar agua y debe continuar consumiendo todos sus medicamentos, excepto la aspirina.
- Si usted usa Aspirina esta debe ser suspendida 5 días antes del control
- Será evaluado por un Médico residente de Cardiología, quien revisará sus antecedentes clínicos.
- Mediante una punción venosa se extraerán 40cc de sangre por única vez (2/3 de taza chica de café)
- La extracción de las muestras de sangre es igual que para cualquier examen de laboratorio clínico, el procedimiento demora alrededor de 10 minutos
- Se le dará un desayuno posterior a la toma del examen
- Se le entregará ayuda financiera para asistir a este control (\$2000 pesos)
- Sus muestras de sangre no se utilizarán para estudios genéticos
- Sus muestras de sangre no se usarán en estudios posteriores, y si, por alguna razón fuera necesario hacer otras determinaciones, le solicitaremos un nuevo consentimiento.
- Las muestras ya utilizadas serán eliminadas de inmediato o se conservan hasta el fin del proyecto de investigación. Sus muestras de sangre estarán bajo la custodia del Dr. Diego Mezzano, en el laboratorio de hemostasia y trombosis UC.
- Los resultados obtenidos en el estudio de su sangre le serán informados a Ud. personalmente si así lo requiere o al médico que Ud. designe.

#### BENEFICIOS

Usted no tendrá beneficios por participar este estudio. Sin embargo, la información que se obtendrá será de utilidad para conocer más acerca del funcionamiento de las plaquetas en pacientes diabéticos eventualmente podría beneficiar a otras personas con su misma condición más adelante.

#### RIESGOS

Los únicos riesgos son los relacionados con la punción venosa, pudiese experimentar dolor, aparición de equimosis (moretón) y muy rara vez infección en el sitio de punción.

#### COSTOS

Los costos derivados por su participación en este estudio no recaerán, bajo ninguna circunstancia en Ud. Este estudio no cubre los costos asociados al manejo médico habitual de su condición de salud actual.

#### CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN

La información obtenida se resguardará de forma confidencial y anónima. Su nombre al momento del análisis de los datos, será reemplazado por un código. La información clínica de Ud. ingresará a una base de datos común para su análisis posterior.

Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su nombre jamás será conocido por la comunidad.

#### VOLUNTARIEDAD

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria.



Pontificia Universidad Católica de Chile

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN  
ESTUDIO CLÍNICO Noviembre 2014.

Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento y retirarse de esta investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución y no se verá afectada la calidad de la atención médica que merece.

Si usted retira su consentimiento, sus muestras de sangre, serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.

#### PREGUNTAS

Si tiene preguntas acerca de esta investigación médica puede contactar o llamar al Dr. Luis Quiñifir, Investigador Responsable del estudio, al teléfono celular 9-6140056, lrquinir@uc.cl

Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede llamar a la Dra. Beatriz Shand Klagges, Presidente del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, al teléfono 2354-8173, o enviar un correo electrónico a: [etica.investigacion@med.puc.cl](mailto:etica.investigacion@med.puc.cl)



#### DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

- Se me ha explicado el propósito de esta investigación médica, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee.
- Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado o forzada a hacerlo.
- No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.
- Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación esta investigación médica según mi parecer y en cualquier momento que lo desee.
- Yo autorizo al investigador responsable y sus colaboradores a acceder y usar los datos contenidos en mi ficha clínica para los propósitos de esta investigación médica.
- Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

#### FIRMAS

- Participante: Nombre \_\_\_\_\_  
Firma y fecha \_\_\_\_\_
- Investigador: Nombre \_\_\_\_\_  
Firma y fecha \_\_\_\_\_
- Director de la institución o su Delegado:  
  
Nombre \_\_\_\_\_  
Firma y fecha \_\_\_\_\_



Pontificia Universidad Católica de Chile

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN  
ESTUDIO CLÍNICO Noviembre 2014.