



**Universidad
Andrés Bello®**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Medicina

Escuela de Tecnología Médica

**ACTIVIDAD PROCOAGULANTE DEL FACTOR TISULAR
PLAQUETARIO EN PACIENTES CON DIABETES
MELLITUS TIPO II ASOCIADOS A EVENTOS
CARDIOVASCULARES**

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

Autores:

Claudia Beatriz López Cisternas, César Andrés Ortúzar Muñoz.

Tutor: BQ. Olga Teresa Panes Becerra.

Santiago de Chile, 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a nuestra tutora BQ. Olga Panes Becerra, por todos los conocimientos brindados, la exigencia, la orientación, el tiempo que nos otorgó para responder nuestras dudas y en especial a la confianza que puso en nosotros para realizar este proyecto.

Sin dejar de lado, agradecemos también a todo el personal de trabajo que conforma el Laboratorio de Hemostasia y Trombosis de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por el apoyo que nos brindaron, por los conocimientos que nos entregaron, por la compañía y la alegría que nos transmitieron día a día y por hacernos sentir que fuimos parte de un equipo de trabajo encabezado por el Dr. Diego Mezzano Abedrapo y conformado por: Dra. Valeria Matus, Dra. Claudia Sáez, TM. Blanca Muñoz, TM. Elizabeth Araya, TM. Pablo Riquelme, TM. Rocío Valencia, BQ. Guillermo Valenzuela, BQ. Macarena Palominos, BQ Luz María Pozo, TNS: Héctor Higuera y Johanna Cárcamo.

Gracias a todos por brindarnos su apoyo por impulsar nuestro desarrollo y formación como futuros profesionales de la salud.

ÍNDICE

CAPÍTULO N°1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	8
1.1 Diabetes mellitus	8
1.2 Hemostasia y alteraciones	9
1.3 Función y disfunción plaquetaria.....	11
1.4 Función y disfunción endotelial	13
1.5 Diabetes y enfermedad cardiovascular.....	15
1.6 Factor tisular y plaquetas	16
CAPÍTULO N°2: HIPÓTESIS	18
CAPÍTULO N°3: OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo General.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
CAPÍTULO N°4: METODOLOGÍA.....	20
4.1 Tipo de estudio	20
4.2 Lugar de realización.....	20
4.3 Población en estudio.....	20
4.4 Criterios de inclusión.....	21
4.5 Criterios de exclusión.....	21
4.6 Toma de muestra	21
4.7 Mediciones bioquímicas y hematológicas	22
4.8 Variables estudiadas.....	22
4.8.1 TLC	22
4.8.2 Agregación y decreción plaquetaria	23
4.8.3 Generación de trombina.....	24
4.8.4 APC	25
4.8.5 Citometría de flujo	25
4.8.6 PAI-1.....	26
4.8.7 Complejo trombina-antitrombina.....	26
4.8.8 AOPP	26
4.8.9 Cuantificación de TNF- α e IL6	27

4.8.10	PCR ultrasensible.....	27
4.8.11	Cuantificación de Ag y unión a colágeno del FvW.....	27
4.8.12	Cuantificación de fibrinógeno.....	27
4.9	Análisis estadístico de los resultados.....	28
CAPÍTULO N°5: RESULTADOS		29
5.1	Características de la población	29
5.2	Actividad fibrinolítica	30
5.3	Función plaquetaria.....	32
5.4	Generación de trombina <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	34
5.5	APC-FT	37
5.6	Citometría de flujo	38
5.7	Marcadores de inflamación y estrés oxidativo	40
5.8	Marcadores de daño endotelial.....	41
5.9	Cuantificación de marcadores de enfermedad cardiovascular	42
CAPÍTULO N°6: DISCUSIÓN		44
CAPÍTULO N°7: CONCLUSIÓN.....		47
CAPÍTULO N°8: REFERENCIAS.....		48
CAPÍTULO N°9: ANEXOS.....		54
9.1	Anexo 1: Documentos de consentimiento informado	54
9.2	Anexo 2: Certificado de aprobación	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: <i>Criterios para el diagnóstico de diabetes</i>	9
Tabla N°2: <i>Ejemplos de mecanismos implicados en la enfermedad macrovascular diabética</i>	16
Tabla N°3: <i>Características de la población</i>	30

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1: <i>Curva de formación y lisis del coágulo</i>	23
FIGURA N°2: <i>Parámetros de la técnica generación de trombina</i>	24
FIGURA N°3: <i>Tiempo Lisis del Coágulo</i>	31
FIGURA N°4: <i>Concentraciones del Inhibidor del activador del plasminógeno</i>	32
FIGURA N°5: <i>Agregación plaquetaria con agonistas en concentraciones sub-umbrales</i>	33
FIGURA N°6: <i>%Secreción plaquetaria de serotonina</i>	34
FIGURA N°7: <i>Generación de trombina; Potencial endógeno de producir trombina</i>	35
FIGURA N°8: <i>Índice de velocidad de generación de Trombina</i>	36
FIGURA N°9: <i>Concentración complejos trombina anti-trombina</i>	36
FIGURA N°10: <i>Actividad procoagulante dependiente de Factor Tisular Plaquetario</i>	37
FIGURA N°11: <i>Citometría de Flujo</i>	39
FIGURA N°12: <i>Marcadores de Inflamación</i>	40
FIGURA N°13: <i>Marcadores de estrés oxidativo</i>	41
FIGURA N°14: <i>Marcadores de daño endotelial</i>	42
FIGURA N°15: <i>Concentración de Fibrinógeno determinada por técnica de Clauss</i>	43

RESUMEN

La diabetes mellitus se asocia al aumento de riesgo de eventos cardiovasculares debido a que produce diversas alteraciones que llevarían a un estado protrombótico, tales como: cambios en la función plaquetaria, daño endotelial, aumento de los mediadores inflamatorios (TNF α , IL-1, IL-6 y otros) y del Factor Tisular plasmático.

Dentro de las alteraciones nombradas, una de las principales es la que compromete la función plaquetaria, ya que las plaquetas tienen un rol predominante en la hemostasia, debido a que aportan una barrera física que impide la pérdida de sangre y participan en las etapas iniciales de formación del trombo.

El factor tisular tiene un papel crítico en la hemostasia, especialmente en la iniciación de la coagulación. Tradicionalmente se ha considerado a los monocitos o células mononucleares de sangre periférica como fuente predominante de factor tisular, sin embargo, nuevas investigaciones indican la relevancia de las plaquetas en la expresión y aporte de factor tisular activo. Por esta razón estudiamos la actividad procoagulante dependiente de factor tisular plaquetario en pacientes con diabetes mellitus tipo II y que además hayan estado asociados a eventos cardiovasculares, para determinar si la hipercoagulabilidad se debe al aporte de factor tisular circulante por parte de las plaquetas.

Se estudiaron 20 pacientes con Diabetes Mellitus tipo II con eventos cardiovasculares, 16 pacientes con diabetes mellitus tipo II sin eventos cardiovasculares y 15 controles sanos, pareados por sexo y edad. A los tres grupos se les determinó la actividad procoagulante dependiente de factor tisular en plaquetas lavadas y generación de trombina 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 marcadores de inflamación, daño endotelial y estrés oxidativo ni en la actividad procoagulante dependiente de factor tisular plaquetario entre ambos grupos. Sin embargo, la medición de generación de trombina, tiempo de lisis del coágulo, función plaquetaria y Anexina V (citometría de flujo) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio.

El tratamiento con estatinas pudo influir en la escasa diferencia encontrada en los parámetros estudiados para los distintos grupos, ya que estos medicamentos disminuyen tanto los parámetros de inflamación como de APC-TF en plaquetas.

Palabras claves: Diabetes, Factor Tisular, Hipercoagulabilidad

CAPÍTULO N°1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

1.1 Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico de múltiples etiologías, caracterizado por hiperglicemia crónica con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas y que resulta de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina ⁽¹⁾. La hiperglicemia crónica de la diabetes se asocia a largo plazo con disfunción e insuficiencia de diversos órganos, especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos ⁽²⁾.

Los signos y síntomas de la hiperglicemia marcada incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, a veces con polifagia y visión borrosa. También puede estar acompañada por deterioro del crecimiento y la susceptibilidad a ciertas infecciones ⁽²⁾. Los pacientes con diabetes tienen una mayor incidencia de alteración cardiovascular aterosclerótica, arterial periférica y enfermedad cerebrovascular ⁽¹⁾.

Existen tres tipos de diabetes: DM tipo I, tipo II y la diabetes gestacional. La DM tipo I se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona ⁽³⁾. La DM tipo II es una enfermedad metabólica crónica que resulta de defectos tanto en la secreción de insulina como en la acción de la insulina ⁽⁴⁾. La diabetes gestacional es una alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono de gravedad variable que se inicia o se detecta por primera vez durante el embarazo ⁽⁵⁾.

En el presente estudio nos enfocaremos en pacientes con DM tipo II. La DM tipo II 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 ⁽⁶⁾. Para poder diagnosticar la diabetes se debe cumplir con al menos uno de los criterios enumerados en la Tabla N° 1. La glicemia se determina en plasma venoso por métodos enzimáticos y la hemoglobina glicosilada (HbA1c) siguiendo un método trazable al de la International Federation of Clinical Chemistry ⁽⁷⁾.

Tabla N° 1: Criterios para el diagnóstico de diabetes

Glicemia (en cualquier momento) \geq 200 mg/dL, asociada a síntomas clásicos, como la poliuria, polidipsia, polifagia, etc.

Glicemia en ayunas (al menos durante 8 horas) \geq 126 mg/dL.

Respuesta a la sobrecarga a la glucosa (75 g) alterada con una glicemia a los 120 minutos post sobrecarga \geq 200 mg/dL.

HbA1c $>$ 6,5%. *

Tabla N°1: *Criterios para el diagnóstico de diabetes.* * En ausencia de niveles inequívocos de hiperglucemia, los resultados deben ser confirmados por repetición de pruebas. (*Standards of Medical Care in Diabetes – 2015*) ⁽⁸⁾

1.2 Hemostasia y alteraciones

La DM está asociada a disturbios en la hemostasia que pueden contribuir al desarrollo de una marcada tendencia trombótica, principalmente se ha observado aumento del fibrinógeno, Factor VIII (FVIII) y Factor de von Willebrand (FvW) ⁽⁹⁾. Estudios realizados demostraron que en la población

diabética los niveles de inhibidores fisiológicos de la coagulación: proteína S (PS) y antitrombina III (ATIII) son significativamente menores, mientras que, el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) presenta niveles significativamente mayores, lo que confirma la tendencia al estado protrombótico en los diabéticos ⁽¹⁰⁾.

El factor tisular (FT) es una glicoproteína de 47 kDa que está conformada por 3 dominios con estructuras y funciones definidas. El dominio o porción externa se une al Factor VII (FVII) (tanto en su forma activa como inactiva) y tiene un rol definitivo en la activación de la coagulación. El FT tiene un papel crítico en la hemostasia ya que su exposición a las zonas vasculares dañadas juega un rol fundamental como iniciador de la coagulación. El FT forma un complejo con el Factor VII activado (FVIIa) donde es necesaria la presencia de calcio, de esta manera se inicia una cascada de activaciones sucesivas de distintos factores ⁽¹¹⁾. El modelo de cascada clásica publicado por Macfarlane el año 1964 consistía en una serie de pasos de activación proteolítica secuencial ⁽¹²⁾ en donde la importancia de las células es el aporte de fosfolípidos aniónicos de la superficie de las plaquetas activadas, en las que se ensamblan los complejos de la coagulación ⁽¹¹⁾.

En el nuevo modelo de la coagulación o modelo celular de la coagulación, publicado por Hoffman y otros investigadores, las vías intrínseca y extrínseca van unidas casi desde el inicio del proceso ⁽¹²⁾. El modelo celular ha permitido explicar las causas *in vivo* de las alteraciones y patologías de la coagulación ⁽¹³⁾, este es el modelo que más se acepta en la actualidad y le da a las células un papel esencial en el proceso de la coagulación ⁽¹⁴⁾. Además se propone al FT como el principal activador fisiológico de la coagulación ⁽¹¹⁾, dividiendo a la hemostasia en tres etapas:

Iniciación: Tiene lugar sobre una célula portadora de FT (fibroblasto, monocito activado, etc.) ⁽¹¹⁾. El FT se une al FVII formando un complejo FT/FVIIa ⁽¹³⁾, como consecuencia de esto se activa el Factor X (FX) que permite

transformar pequeñas cantidades de protrombina en trombina en la superficie celular ⁽¹²⁾ las cuales actúan de manera local ⁽¹⁴⁾.

Amplificación: La respuesta coagulante se traslada de la célula portadora de FT a la superficie de la plaqueta ⁽¹¹⁾. Las plaquetas se adhieren a la superficie subendotelial y son activadas por la trombina formada en la etapa anterior ⁽¹²⁾, además se acumulan factores de la coagulación activados en su superficie. ⁽¹¹⁾

Propagación: Los complejos tenasa y protrombinasa se ensamblan en la superficie de las plaquetas y se genera trombina a gran escala ⁽¹¹⁾, lo que permite tener una cantidad considerable de fibrina necesaria para estabilizar el tapón plaquetario ⁽¹²⁾.

1.3 Función y disfunción plaquetaria

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados generados a partir de megacariocitos. Tienen una vida media de 7 a 10 días en circulación. En condiciones de reposo tienen forma discoide y un tamaño comprendido entre 2 y 3 μm ⁽¹⁵⁾. La función principal de las plaquetas es la hemostasia primaria, formando un trombo en las zonas de daño vascular ⁽¹⁶⁾. Para ello, las plaquetas pasan por un cambio conformacional, se adhieren a la superficie subendotelial, secretan el contenido de sus gránulos intracelulares, y se agregan para formar un trombo en respuesta a estímulos generados en el endotelio de los vasos sanguíneos dañados ⁽¹⁷⁾.

Cuando se produce una lesión endotelial se exponen estructuras subendoteliales, como el colágeno I y III, a las cuales se adhieren las plaquetas ⁽¹⁸⁾. El proceso de adhesión se inicia gracias a la glicoproteína plaquetaria Ib (GPIb) que se une al colágeno y al FvW. La interacción transitoria entre el FvW y la GPIb permite que las plaquetas comiencen a “adherirse” sobre la

zona dañada del vaso, lo que trae como resultado que las proteínas contenidas en la pared vascular (especialmente el colágeno) induzcan la activación de las plaquetas. Durante esta interacción entre plaqueta y colágeno participan también la glicoproteína VI (GPVI) y la integrina $\alpha 2\beta 1$. La GP VI también media la activación de las plaquetas permitiendo una firme adhesión de las plaquetas y la secreción de sustancias procoagulantes y proinflamatorias contenidas en ellas ⁽¹⁹⁾.

Después de la unión de las plaquetas al colágeno ocurre la expresión de fosfatidilserina (FS) sobre la membrana plaquetaria, la cual genera una actividad protrombinasa que aumenta la formación de trombina ⁽¹⁹⁾. La FS es un fosfolípido de la membrana plaquetaria que se localiza principalmente en la mitad interna de la bicapa ⁽²⁰⁾. La expresión de FS en las plaquetas activadas puede ser detectada directamente por la unión de anexina-V conjugada con un fluorocromo mediante la técnica de citometría de flujo ⁽²¹⁾.

La P-selectina (CD62) es una proteína que se encuentra en la membrana de los gránulos α de las plaquetas en reposo. Cuando las plaquetas se activan los gránulos α plaquetarios liberan su contenido y su membrana se fusiona con la membrana celular, por lo que esta molécula llega a convertirse en una proteína que forma parte de la cara externa de la membrana celular. La cuantificación de P- selectina es un importante indicador de activación plaquetaria y su función puede medirse a través del anticuerpo monoclonal anti CD62P empleando técnicas de citometría de flujo ⁽²²⁾.

Algunos estudios sobre agregación plaquetaria inducida con distintos agonistas (ADP, trombina, colágeno y fibrinógeno) a diferentes concentraciones de glicemia, han demostrado que a mayores concentraciones de glucosa hay mayor incremento de la agregación plaquetaria ⁽²³⁾.

La causa principal de morbimortalidad del paciente diabético es la arteriosclerosis coronaria y periférica. En estos pacientes se ha encontrado con

frecuencia la presencia de plaquetas activadas lo que contribuiría a la tendencia trombótica ⁽²⁴⁾.

La hiperglicemia crónica produce cambios en la bioquímica y fisiología de las plaquetas y contribuye a la hiperactividad plaquetaria propia de la DM tipo II. Ocurren dos efectos proaterogénicos que elevan la actividad plaquetaria en los sitios de daño endotelial: la hipersensibilidad plaquetaria a los agonistas y la hiposensibilidad a los antiplaquetarios terapéuticos. La disfunción plaquetaria (hiperactividad y resistencia a la inhibición por la insulina) junto con una producción endotelial menor de PGI₂ y óxido nítrico (ON) elevan el riesgo aterotrombótico de la DM tipo II ⁽¹⁸⁾.

Otra consecuencia de la hiperglicemia es la glicación no enzimática de la membrana plaquetaria que conlleva a la formación de productos finales de la glicación, los cuales alteran la estructura, modifican la permeabilidad selectiva y generan una dinámica anormal de los fosfolípidos de membrana ⁽¹⁷⁾, lo que aumenta la propensión de las plaquetas a la activación ⁽²⁵⁾.

1.4 Función y disfunción endotelial

El endotelio desempeña un papel clave en la regulación del tono vascular y el flujo sanguíneo. A este respecto, el endotelio produce moléculas vasodilatadoras tales como ON, prostaciclina, factor de hiperpolarización derivado del endotelio, y vasoconstrictoras incluyendo endotelina-1 y angiotensina II ⁽²⁶⁾.

En los pacientes con DM se han encontrado en plasma niveles aumentados de marcadores de disfunción endotelial, como la trombomodulina, moléculas de adhesión celular, PAI-1, factor de crecimiento endotelial vascular, lipoproteína asociada con la fosfolipasa A2, mieloperoxidasa y paroxonasa (enzima capaz de hidrolizar peróxidos lipídicos y moléculas inflamatorias) así

como de marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva (PCR), interleuquinas 1 y 6 (IL-6), TNF- α y el receptor del TNF- α ⁽²⁷⁾.

En la DM existe un importante deterioro de la función endotelial, la cual es responsable de las complicaciones vasculares (microangiopatía y macroangiopatía). La disfunción endotelial diabética cursa con una disminución de la producción de los factores vasodilatadores y un incremento en los factores vasoconstrictores ⁽²⁸⁾.

Estudios han demostrado que existe un incremento en la producción de prostanoides vasoconstrictores como el tromboxano A2 y su precursor inmediato la prostaglandina H2 que se relaciona a su vez con una liberación mayor de ácido araquidónico. Una metabolización anómala de este ácido cursa con un incremento en la producción de radicales libres y superóxidos ⁽²⁹⁾.

Agentes oxidantes, tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^-), ácido hipocloroso (HClO) y radicales lipídicos son altamente reactivos con otras moléculas biológicas y se denominan como especies reactivas de oxígeno (ROS) ⁽³⁰⁾. A bajas concentraciones los ROS participan en procesos celulares fisiológicos, pero en altas concentraciones, producen cambios en la estructura de componentes celulares (lípidos, proteínas y DNA) desencadenando un estrés oxidativo ⁽³¹⁾. Los ROS disminuyen el metabolismo de la glucosa a través de la glicólisis, y la incrementan por vías alternativas de hexosamina y flujo a través de los polioles ⁽²⁸⁾.

El estrés oxidativo conduce a la oxidación de las LDL. Se ha demostrado que las principales fuentes de agentes oxidantes y ROS en los vasos ateroscleróticos son los macrófagos y las células musculares lisas ⁽³²⁾. De hecho, la hipercolesterolemia estimula la producción de radicales O_2^- en la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, evento que produce una mayor oxidación de las LDL ⁽³³⁾.

Durante el estrés oxidativo también aumentan los productos de proteína de oxidación avanzada (AOPP) que se forman por la acción de oxidantes clorados, tales como ácido hipocloroso y las cloraminas (producidas por la mieloperoxidasa en neutrófilos activados) y se encuentran elevados en pacientes con complicaciones renales, DM y aterosclerosis ⁽³⁴⁾.

1.5 Diabetes y enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. La DM es un factor de riesgo importante para la enfermedad cardiovascular y contribuye a producir devastadoras consecuencias económicas ⁽³⁵⁾.

La DM es un importante factor pronóstico que se asocia a una mayor extensión de la enfermedad coronaria (EC), con un curso más agresivo y una morbimortalidad más elevada que en pacientes coronarios sin DM ⁽³⁶⁾.

Las alteraciones metabólicas (generalmente crónicas) y hematológicas características de los diabéticos favorecen la progresión precoz, severa y rápida de la EC que junto con otros factores de riesgo como hipertensión arterial, obesidad, dislipidemia, entre otros, aumentan la tasa de mortalidad y limitan la calidad y esperanza de vida ⁽³⁷⁾.

En la Tabla N° 2 se enumeran algunos mecanismos implicados en la enfermedad macrovascular diabética en diferentes tipos de células.

Tabla N° 2: Ejemplos de mecanismos implicados en la enfermedad macrovascular diabética ⁽³⁸⁾	
Tipo de célula	Mecanismos
Endoteliales	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de ROS - Disminución de la biodisponibilidad de ON - Aumento de productos de peroxidación lipídica - Aumento de la glicación (PGA)
Macrófagos derivados de monocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento IL1β, IL6, CD36 (GP1V) - Activación de proteína-quinasa C
Vasculares (musculares lisas)	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de la proliferación - Aumento de la migración a la capa íntima - Aumento de la degradación de la matriz - Alteración de los componentes de la matriz (condroitin, dermatan sulfato) - Aumento de la glicación no enzimática de colágeno - Aumento de ROS

Tabla N°2: *Mecanismos que están implicados en la enfermedad macrovascular diabética.*

1.6 Factor tisular y plaquetas

El FT como se describió anteriormente es el iniciador de la cascada de la coagulación y constituye un proteína clave en la concepción actual del sistema hemostático ⁽³⁹⁾.

El FT está presente en los núcleos ricos en lípidos de las placas ateroscleróticas inestables, lo que puede ser un factor determinante en la trombogenicidad de las placas. Durante la rotura de la placa, la interacción de FT con el FVIIa contribuye sustancialmente a la rápida formación del trombo oclusivo, que es el paso final a la enfermedad isquémica coronaria ⁽⁴⁰⁾.

Se sabe que el daño endotelial y la formación de placas ateromatosas está relacionado con el FT circulante, pero el real origen y los elementos celulares que poseen este FT activo aún es objeto de controversia.

Tradicionalmente se ha considerado a los monocitos o células mononucleares de sangre periférica como fuente predominante de FT en circulación ⁽⁴¹⁾, ya que una activación prolongada de estos por lipopolisacáridos de origen bacteriano inducen a la activación transcripcional del gen de FT, lo que genera una expresión aumentada de este factor ⁽⁴⁰⁾.

Nuevas investigaciones han comenzado a relacionar a las plaquetas como fuente importante de FT. En algunos estudios se establece que el FT se transfiere a las plaquetas desde micropartículas derivadas de monocitos y otros granulocitos ⁽⁴²⁾. En otros trabajos se ha encontrado que el FT estaría presente en los gránulos alfa y en el sistema canicular abierto de plaquetas circulantes ⁽⁴³⁾.

Por otro lado se ha descrito que las plaquetas poseen mRNAs de FT proveniente de los megacariocitos y serían potencialmente capaces de sintetizar esta proteína ⁽⁴⁴⁾. Además se ha demostrado en los resultados de otros estudios que las plaquetas en reposo contienen pre-mRNA de FT pero no lo expresan en niveles significativos. En contraste, al momento de ser activadas, las plaquetas utilizan su maquinaria de transcripción y traducción, lo que permite la expresión tanto de mRNA maduro como de proteína bioactiva de FT. En base a esto demostraron que la activación plaquetaria aumenta la actividad procoagulante dependiente de FT (APC-FT) ⁽⁴⁵⁾.

A raíz de los últimos estudios que han demostrado la capacidad de las plaquetas de expresar FT funcional, proponemos estudiar la APC dependiente de FT plaquetario en pacientes con DM tipo II y que además hayan estado asociados a eventos cardiovasculares, para poder verificar si la hipercoagulabilidad que presentan estos pacientes se debe al aporte de FT circulante por parte de las plaquetas.

CAPÍTULO N°2: HIPÓTESIS

Pacientes con DM tipo II, poseen un aumento de la actividad procoagulante dependiente de FT plaquetario, lo que aumentaría el riesgo de enfermedad cardiovascular.

CAPÍTULO N°3: OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la APC-FT plaquetario en pacientes con DM tipo II asociados y no asociados a enfermedad cardiovascular y en pacientes sanos sin diabetes ni eventos cardiovasculares previos.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la APC-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 la actividad fibrinolítica mediante el tiempo de lisis del coágulo (TLC) en PRP y niveles plasmáticos de PAI-1.
- Determinar niveles de marcadores de inflamación, daño endotelial y estrés oxidativo.

CAPÍTULO N°4: METODOLOGÍA

El estudio a realizar 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 Vasculat, del Dr. Luis Quiñiñir.

4.1 Tipo de estudio

Es un estudio de tipo caso control (clínico).

4.2 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 (Ver Anexo 2).

4.3 Población en estudio

Se evaluaron 20 pacientes diabéticos con eventos cardiovasculares previos, 16 pacientes diabéticos sin eventos cardiovasculares asociados y 15

controles sanos sin diabetes ni eventos cardiovasculares previos, los cuales fueron pareados por sexo y edad.

4.4 Criterios de inclusión

- Pacientes diabéticos: con antecedente previo en tratamiento con hipoglicemiantes orales (HGO) o Insulina
- A ambos grupos de diabéticos se les solicitó HbA1c a su ingreso al protocolo
- Pacientes diabéticos con eventos cardiovasculares previos: infarto agudo al miocardio (IAM), angina crónica estable, accidente cardiovascular (ACV), accidente isquémico transitorio (TIA)
- Firma consentimiento Informado

4.5 Criterios de exclusión

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

4.6 Toma de muestra

Tanto a los controles como a casos se les realizó una punción venosa periférica con mariposa calibre 19G, con el fin de obtener una adecuada

obtención de plaquetas, previa lectura del consentimiento informado (Ver Anexo 1).

A cada uno se le tomaron 2 tubos EDTA (Tapa Lila), 6 tubos citrato de sodio (Tapa Celeste), 1 tubo suero (Tapa Amarilla) 1 tubo Glucosa (Tapa Gris) y 2 tubos con anticoagulante ACD preparados por el laboratorio.

4.7 Mediciones bioquímicas y hematológicas

Las muestras de los casos y controles fueron enviadas y posteriormente procesadas en el Laboratorio Clínico central Red Salud UC-Christus, donde se les realizaron las siguientes determinaciones:

- Perfil bioquímico y lipídico.
- Hemograma y recuento plaquetario.
- Creatinina plasmática.
- Alanino-amino transferasa sérica.
- Creatinina kinasa sérica.
- HbA1c.

4.8 Variables estudiadas

4.8.1 TLC

Para evaluar la actividad fibrinolítica de los grupos en estudio se midió el TLC en PRP según Panes y cols⁽⁴⁶⁾. El PRP se estimuló con agonistas plaquetarios, como ristocetina (1,2 mg/mL) y TRAP (20 µM).

Se registró el cambio de turbidez a 405 nm y 37° C durante 240 minutos, mediante un lector de micro-placas (Termo ScientificMultiskan FC, MicroplatePhotometer). El TLC obtenido corresponde al tiempo en que la absorbancia cae al 50% de su valor al momento de formarse el coágulo.

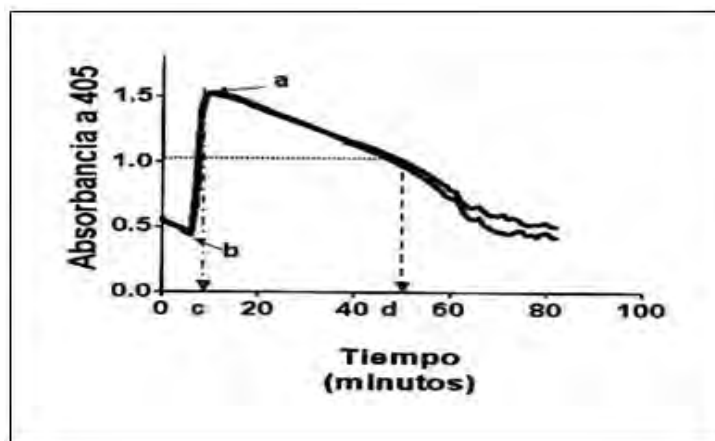


Figura N°1: Curva de formación y lisis del coágulo. **a:** Máxima de absorbancia, **b:** Absorbancia basal, **c:** Tiempo en que se alcanza el máximo de absorbancia, **d:** Tiempo en que se obtiene la mitad del máximo de turbidez= $(a-b)/2$.

4.8.2 Agregación y secreción plaquetaria

La agregación se realizó en Agregómetro (BioData PAP-8), en donde se analizan y miden los cambios de transmitancia en una suspensión de plaquetas estimuladas con diferentes agonistas (Araquidonato 10 uM, epinefrina 0,5 uM, ADP 0,5 uM, colágeno 0.5 ug/mL y ristocetina 1,2 mg/mL). Se espera que los agonistas causen la agregación de las plaquetas. Este instrumento emite una fuente de luz a 650 nm, la cual incide sobre cada muestra. Cuando se produce la agregación plaquetaria el paso de la luz incidente a través del PRP (%T) es mayor. Los parámetros estudiados son área bajo la curva (AUC) y agregación máxima.

Para determinar la secreción de serotonina se detuvo la agregación con solución de fijación (Stopper). El porcentaje de serotonina liberado se determinó por técnica *High-performance liquid chromatography* (HPLC).

4.8.3 Generación de trombina

La Generación de trombina se realizó en el equipo Thrombinoscope^{IM} Stago de acuerdo a la técnica descrita por Hemker (Técnica CAT), que originalmente utiliza plasma pobre en plaquetas (PPP), pero para este estudio fue modificada, ya que se utilizó PRP previamente activado con ristocetina (1,2 mg/mL) y TRAP (10 μ M). El equipo realiza una cinética de fluorescencia durante 60 minutos.

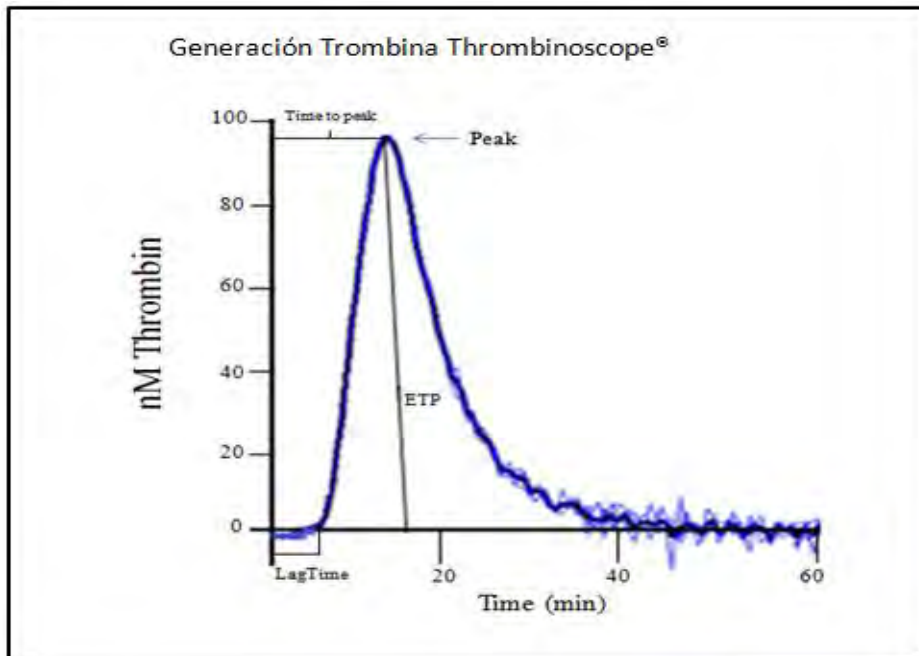


Figura N°2: Parámetros de la técnica generación de trombina.

Los parámetros a medir fueron los siguientes:

- Índice de Velocidad (V_i): peak/time to peak-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.

4.8.4 APC

La APC-FT plaquetario se determinó en plaquetas lavadas por medición de generación de FXa a través de su acción enzimática sobre sustrato cromogénico S22 específico (Aniara Corporation, USA). La intensidad del cromógeno generado se analizó en el equipo Multiskan FC microplatephotometer – Thermo Fisher Scientific (lector de microplaca de ELISA a 37°C). El software utilizado por el equipo es SkanIt, mide a una longitud de onda de 405 nm con una referencia de 620 nm durante 90 minutos.

4.8.5 Citometría de flujo

4.8.5.1 Marcaje de plaquetas lavadas con anexina V

Se determinó la exposición de fosfatidilserina a través de la unión de anexina V, para lo cual se utilizó el equipo BD ACCURI C6, programa C-FLOW SAMPLER con reactivos BD Biosciences (Pharmingen, San Diego, USA).

4.8.5.2 Marcaje de sangre total con anti-CD62

Se determinó P-Selectina a través de citometría de flujo con anti P-Selectina. La muestra se tomó con citrato 3,2% y la sangre completa se adicionó a un tubo con solución de fijación (FACS LYSING). Se utilizó el equipo BD ACCURI C6, programa C-FLOW SAMPLER con reactivos BD Biosciences (Pharmingen, San Diego, USA).

4.8.6 PAI-1

Se determinó PAI-1 mediante ELISA comercial. El protocolo a seguir fue el indicado por el fabricante, HYPHEN Neuville-sur-Oise, Francia.

4.8.7 Complejo trombina-antitrombina

La concentración de complejos trombina-antitrombina fue determinada utilizando ELISA comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.8.8 AOPP

Se determinó AOPP por medio de técnica colorimétrica ⁽⁴⁷⁾ en donde se cuantificaron los niveles de productos de oxidación avanzada de proteínas presentes en el plasma. La medición se realizó a una longitud de onda de 340 nm.

4.8.9 Cuantificación de TNF- α e IL6

Se realizó mediante Elisa comercial, eBioscience Viena, Austria.

4.8.10 PCR ultrasensible

Se cuantificó PCR en plasma mediante técnica ELISA desarrollada por Macy y cols ⁽⁴⁸⁾.

4.8.11 Cuantificación de Ag y unión a colágeno del FvW

Para cuantificar los niveles de FvW antigénico contenido en el plasma se realizó una técnica ELISA modificada de tipo directo. Además se cuantificó la actividad de FvW por unión a colágeno por medio de un ELISA modificado.

4.8.12 Cuantificación de fibrinógeno

Se realizó con un 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.

4.9 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados con Software GraphPad Prism 5.

- Se utilizó prueba t-student, para determinar diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos, cuando la distribución de datos fue normal.
- La prueba de suma de rangos Wilcoxon no paramétrica fue aplicada a dos muestras independientes cuando las muestras no se distribuyeron de forma normal.
- Se consideraron valores estadísticamente significativos a todos los que presentaron un $p < 0,05$.
- Se realizó un análisis descriptivo, para evaluar la distribución de las variables en estudio a partir de medidas de dispersión, gráficas y tabla de frecuencia.

CAPÍTULO N°5: RESULTADOS

5.1 Características de la población

En la Tabla N°3 se muestran los resultados obtenidos de los dos grupos en estudio: pacientes diabéticos con evento cardiovascular (CV) y pacientes diabéticos sin CV, los cuales fueron pareados por sexo y edad.

Los pacientes se separaron en tres grupos: diabéticos con CV, diabéticos sin CV y controles sanos.

Al comparar a los diabéticos con y sin CV con los controles sanos podemos observar que los pacientes diabéticos de ambos grupos tienen niveles aumentados de glicemia y HbA1c con respecto a los controles sanos.

Los controles poseen niveles de colesterol significativamente aumentado con respecto a los casos, esto se debe posiblemente a que los pacientes se tratan con estatinas en una mayor proporción que los controles, como se observa en la Tabla N°3.

	DM con CV (n=20)	DM sin CV (n=16)	Controles (n=15)	Significancia
Género(M/F)	16/4	12/4	11/4	-
Estatinas (Si/No)	19/1	6/10	0/15	-
HGO (Si/No)	17/3	15/1	0/15	-
Edad (años)	60 \pm 6,1 (40-65)	60 \pm 6,4 (41-65)	58,2 \pm 4,3 (50-63)	-
Cintura (cm)	102,8 \pm 7,7	100,7 \pm 8,1	94 \pm 14,7	NS
Hematocrito (%)	44,3 \pm 3,8	42,6 \pm 3,1	43,5 \pm 2,5	NS
R. Plaquetario (x10³/mm³)	234,8 \pm 43	234,7 \pm 55	271,9 \pm 2,5	NS
HbA1C (%)	8 \pm 1,6	7,6 \pm 1,1	5,8 \pm 0,4	+ ▲ (P<0,001)
Glicemia (mg/dL)	150,6 \pm 50,1	147,1 \pm 33,7	95,9 \pm 8,1	+ ▲ (P<0,001)
Creatinina (mg/dL)	0,9 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	NS
CK	124,2 \pm 78,6	116,2 \pm 67	144,2 \pm 100,1	NS
Colesterol Total (mg/dL)	150,8 \pm 43,2	163,2 \pm 46,5	192,3 \pm 37,6	+ (P<0,05)

Tabla N°3: Características de la población. Se observan los resultados bioquímicos de pacientes diabéticos con y sin eventos cardiovasculares (CV) y de controles normales, pareados en sexo y edad. HGO: hipoglicemiante. Se muestran los promedios \pm las desviaciones estándar. NS: No hay diferencia significativa. + Diferencia significativa entre DM con CV y control. ▲ Diferencia significativa entre DM sin CV y Control.

5.2 Actividad fibrinolítica

En la Figura N°3 se muestran los resultados obtenidos del TLC de los individuos en estudio. La medición se realizó en plasma libre de plaquetas (PLP) y en (PRP) estimulado y no estimulado con agonistas plaquetarios. Se observa un aumento significativo del TLC en pacientes con CV con respecto a controles normales. Además se observa un aumento del TLC en los pacientes con CV con respecto a los pacientes sin CV que no alcanza a ser

estadísticamente significativo. Todo esto solo en las plaquetas estimuladas con ristocetina.

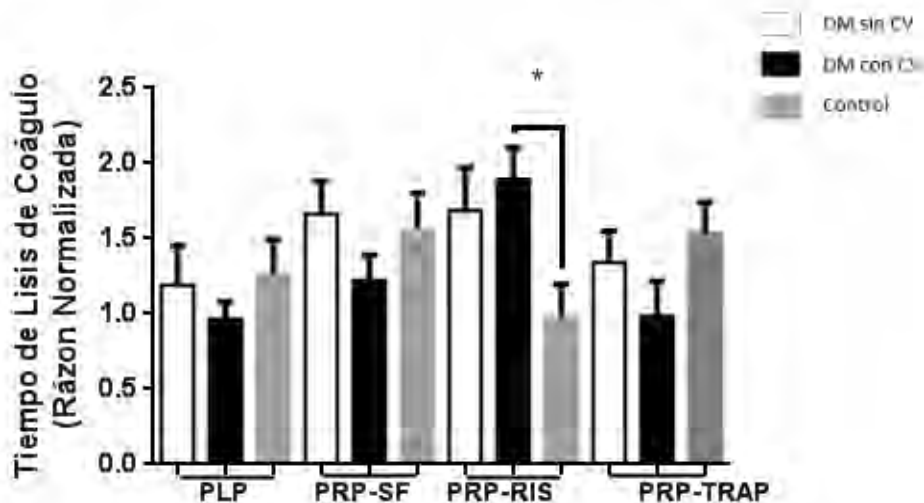


Figura N°3: *Tiempo lisis del coágulo*, en PLP y plaquetas activadas con agonistas plaquetarios. RIS: Ristocetina. TRAP: Péptido activador del receptor de trombina. (* $p < 0,05$; $n = 20$ para DM con CV; $n = 16$ para DM sin CV; $n = 15$ para Control)

El principal determinante de la actividad fibrinolítica es el nivel plasmático de PAI-1, razón por la que se determinó en este estudio. Como muestra la Figura N°4 los pacientes con CV presentan una tendencia al aumento en las concentraciones de PAI-1 que no logran ser estadísticamente significativo.

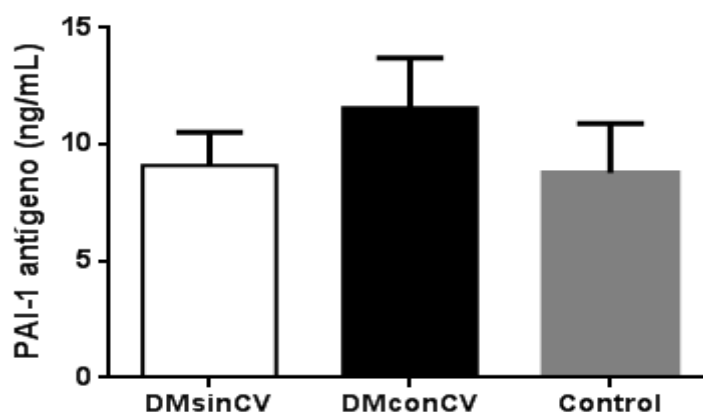


Figura N°4: Concentraciones del Inhibidor del activador del plasminógeno. (n=20 para DM con CV; n=16 para DM sin CV; n=15 para Control)

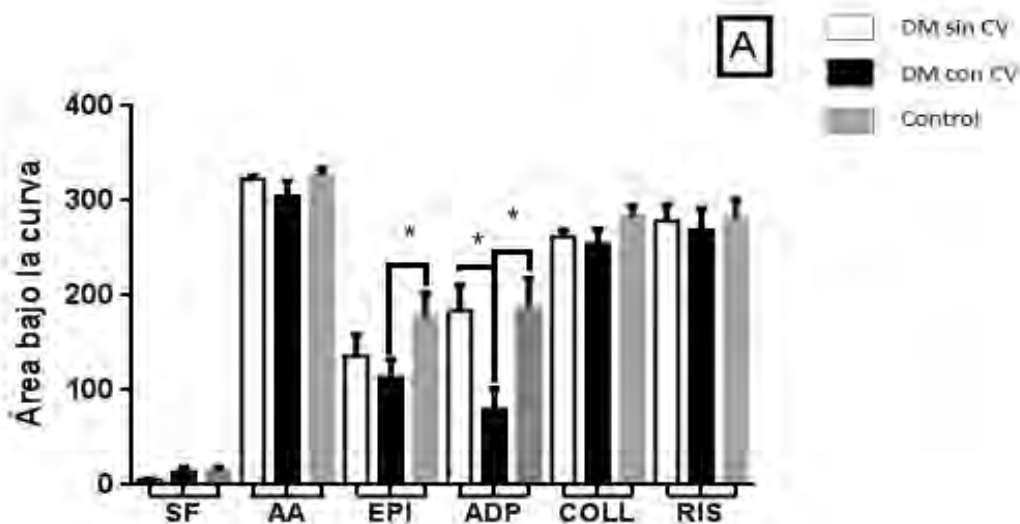
5.3 Función plaquetaria

Se evaluó la función plaquetaria a través de la agregación y secreción plaquetaria, determinada a concentraciones sub-umbrales de agonistas.

En la Figura N°5 se observa la agregación plaquetaria evaluada como AUC y porcentaje máximo de agregación. En el Panel A se observa una disminución significativa del AUC en los pacientes con CV en relación a los controles normales para las plaquetas estimuladas con epinefrina. Además se observa que existe una disminución significativa en el AUC de los pacientes con CV en comparación a los pacientes sin CV y a los controles sanos, cuando se evalúan las plaquetas estimuladas con ADP.

En el Panel B se observa una disminución significativa del porcentaje de agregación máxima en los pacientes con CV al compararlos con los pacientes sin CV y con los controles sanos para las plaquetas estimulados con ADP.

PANEL A:



PANEL B:

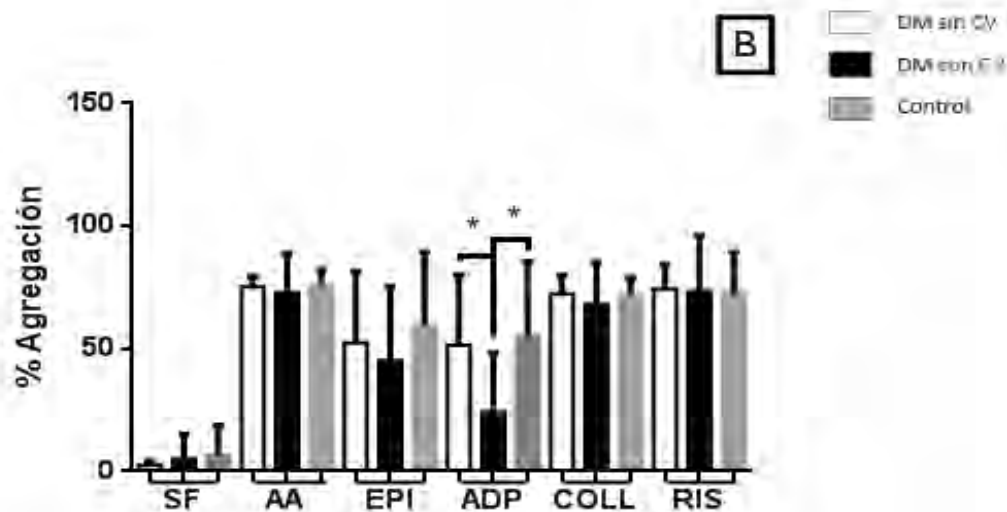


Figura N°5: Agregación plaquetaria con agonistas en concentraciones sub-umbrales: **Panel A:** Área bajo la curva (AUC). SF: Plaquetas con suero fisiológico (No estimuladas). AA: Araquidonato (10µM). EPI: Epinefrina (0,5 µM). ADP: Adenosin Di Fosfato (0,5 µM). COLL: Colágeno (0,5 µg/mL). RIS: Ristocetina (1,2 mg/mL). **Panel B:** Agregación máxima. SF: Plaquetas con suero fisiológico (No estimuladas). AA: Araquidonato (10µM). EPI: Epinefrina (0,5 µM). ADP: Adenosin di fosfato (0,5 µM). COLL: Colágeno (0,5 µg/mL). RIS: Ristocetina (1,2 mg/mL). (*p<0,05; n=20 para DM con CV; n=16 para DM sin CV; n=15 para Control)

En la Figura N°6 se muestran los resultados obtenidos para la secreción plaquetaria. Podemos observar una disminución significativa en los pacientes diabéticos con CV en relación al grupo de pacientes diabéticos sin evento cardiovascular cuando se evalúa la secreción en plaquetas estimuladas con ADP. Lo mismo se observa en los pacientes con evento cardiovascular en relación al grupo control cuando se evalúa la secreción de serotonina de PRP estimulado con ADP.

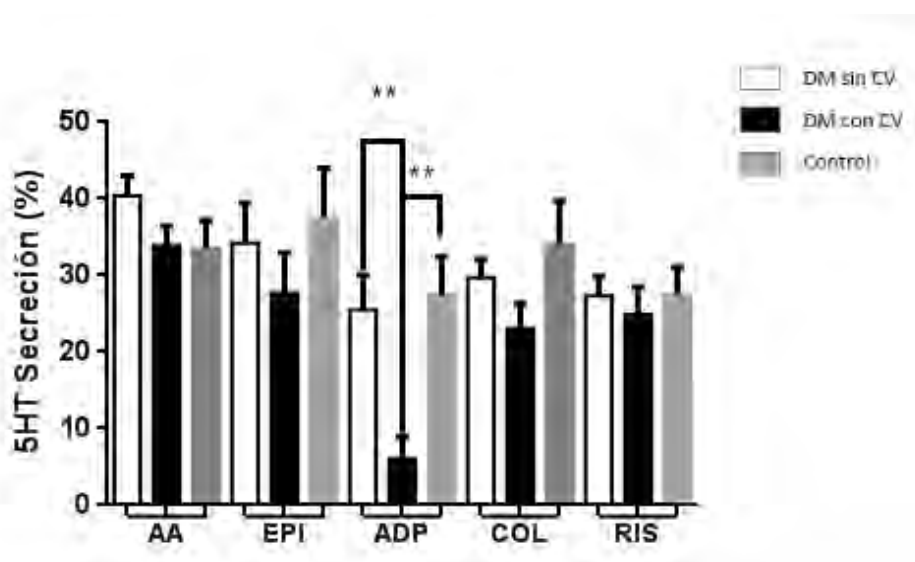


Figura N°6: %Secreción plaquetaria de serotonina. AA: Araquidonato (10 μ M). EPI: Epinefrina (0,5 μ M). ADP: Adenosin di fosfato (0,5 μ M). COL: Colágeno (0,5 μ g/mL). RIS: Ristocetina (1,2 mg/mL). (**p<0,01; n=20 para DM con CV; n=16 para DM sin CV; n=15 para Control).

5.4 Generación de trombina *ex vivo* e *in vivo*

Se quiso ver el estado protrombótico de estos pacientes para lo cual estudiamos la generación de trombina a través de la técnica CAT automatizada.

De los múltiples parámetros que entrega esta técnica nosotros evaluamos el ETP y Vi que da cuenta de la velocidad con que se genera la trombina.

En la figura N°7 se grafican los valores obtenidos al evaluar el ETP, en donde se muestra que en el PRP no estimulado y en el PRP estimulado con TRAP hubo una disminución significativa del ETP en pacientes diabéticos (con y sin CV) con respecto al control normal.

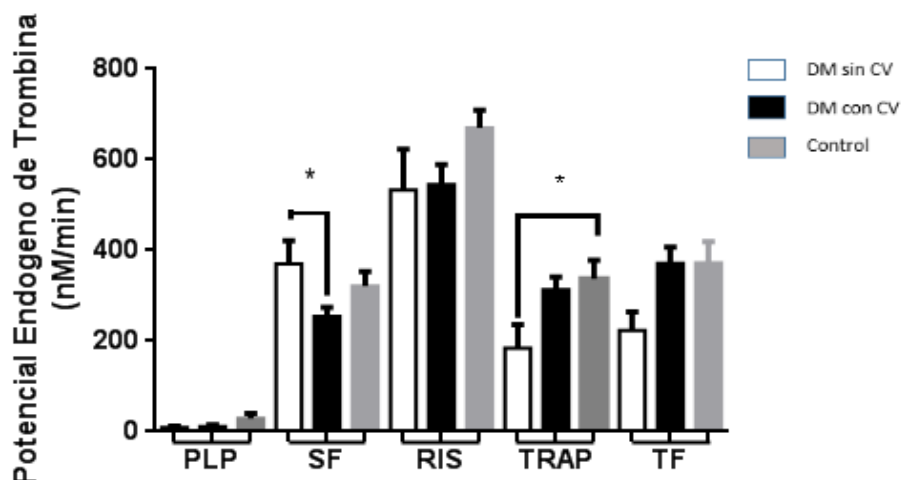


Figura N°7: Generación de trombina; Potencial endógeno de producir trombina ETP. SF: PRP con suero fisiológico o (No estimuladas). RIS: Ristocetina (1,2 mg/mL). TRAP: Péptido análogo del receptor de trombina (10 μ M). TF: PLP con factor tisular. (* $p < 0,05$; $n = 20$ para DM con CV; $n = 16$ para DM sin CV; $n = 15$ para Control)

En la Figura N°8 se grafica el Vi. Al igual que con el ATP se observa una menor velocidad de generación de trombina en pacientes diabéticos con CV en relación a los controles sanos. Además se puede visualizar una tendencia, ya que en cada uno de los agonistas el Vi de los controles es mayor que el de los pacientes diabéticos.

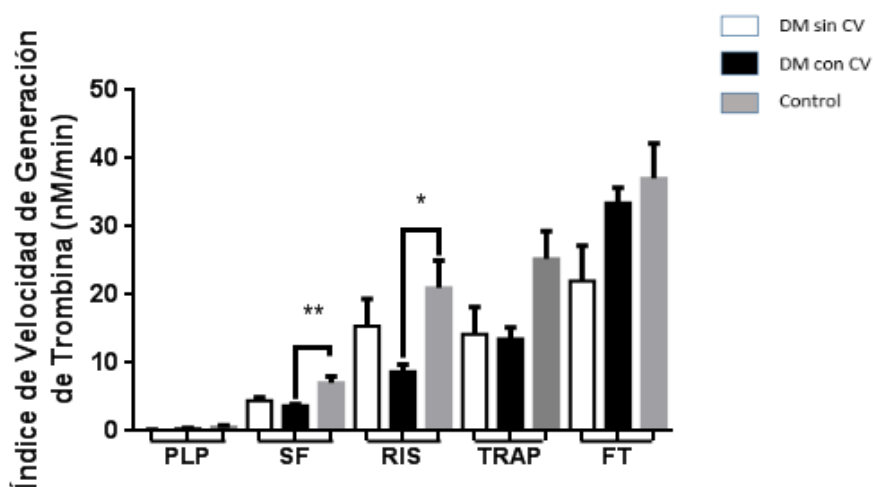


Figura N°8: Índice de velocidad de generación de Trombina, SF: PRP con suero fisiológico (No estimuladas); RIS: Ristocetina (1,2 mg/mL). TRAP: Péptido análogo del receptor de trombina (10 μ M). TF: PLP con factor tisular.; TF: PLP con TF. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 20$ para DM con CV; $n = 16$ para DM sin CV; $n = 15$ para Control)

Para evaluar la generación de trombina *in vivo* se determinaron los niveles del complejo trombina-antitrombina (TAT). En la Figura N°10 se puede apreciar un aumento de los complejos TAT en los pacientes sin evento CV con respecto a controles que no alcanza a ser estadísticamente significativo.

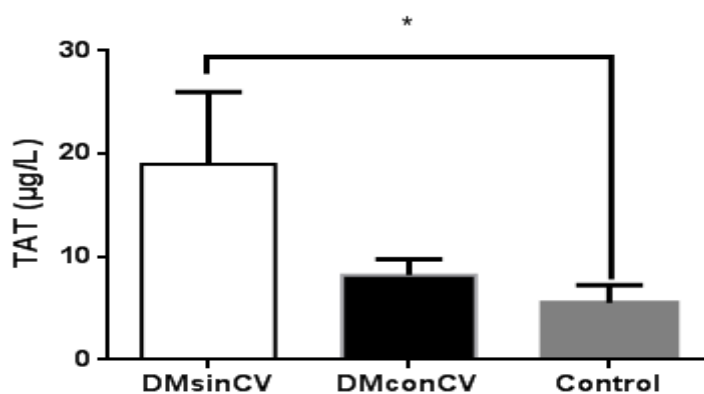


Figura N°9: Concentración complejos trombina anti-trombina (* $p < 0,05$; $n = 20$ para DM con CV; $n = 16$ para DM sin CV; $n = 15$ para Control)

5.5 APC-FT

Se determinó la APC-TF plaquetario en plaquetas lavadas. En la Figura N°10 se muestran los resultados obtenidos, en los cuales se muestra que, para las plaquetas estimuladas con TRAP, existe una disminución estadísticamente significativa en los pacientes con CV en relación al grupo de controles sanos.

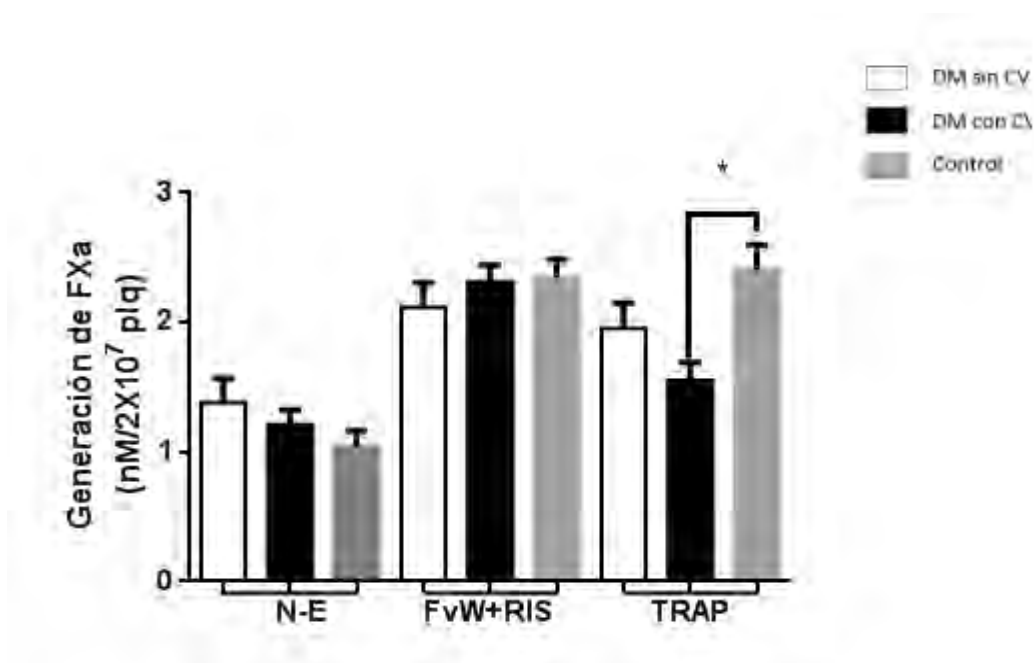


Figura N°10: Actividad procoagulante dependiente de factor tisular plaquetario. Generación de FXa en plaquetas no estimuladas (NE), estimuladas con FvW (0,3 UI/mL) más Ristocetina (1.2 mg/mL) (FvW) o estimuladas con TRAP 10 μ M. (* $p < 0,05$; $n = 20$ para DM con CV; $n = 16$ para DM sin CV; $n = 15$ para Control)

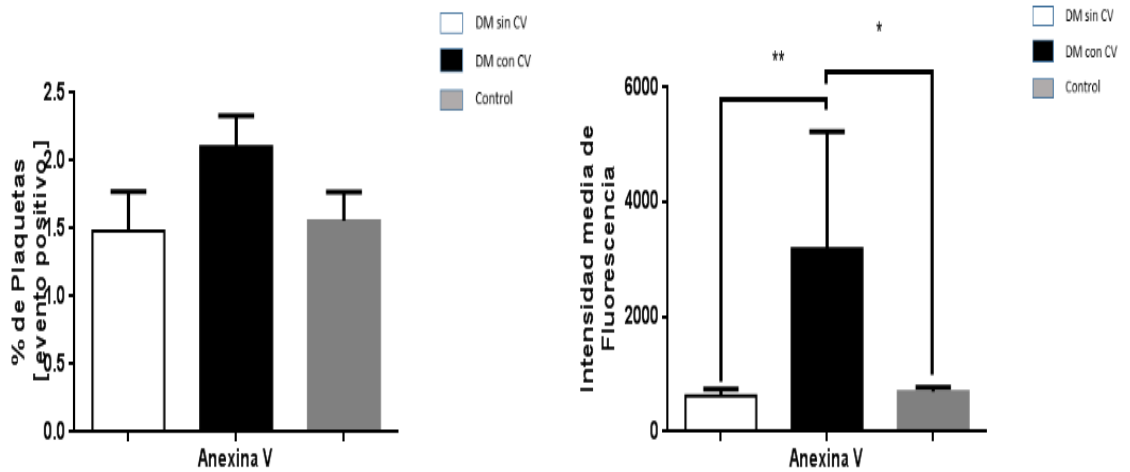
5.6 Citometría de flujo

Se evaluó si existía activación *in vivo* de plaquetas a través de la medición con citometría de flujo de la unión de anexina V a fosfolípidos cargados negativamente y la expresión de P-selectina en la cara externa de las plaquetas.

En la Figura N°11 se observan los resultados obtenidos en la citometría de flujo. En Panel A y B se observa el porcentaje de plaquetas con evento positivo y la intensidad media de fluorescencia (IMF) tanto para anexina V como para P-selectina. Encontramos un aumento estadísticamente significativo en la IMF de anexina V de los pacientes con CV en relación al grupo de pacientes sin CV y al grupo de controles sanos.

Pese a que la P-selectina no mostró significancia estadística ni tendencia se puede apreciar que los diabéticos con CV tienen más expresión de P-selectina en sus plaquetas que los controles sanos.

Panel A:



Panel B:

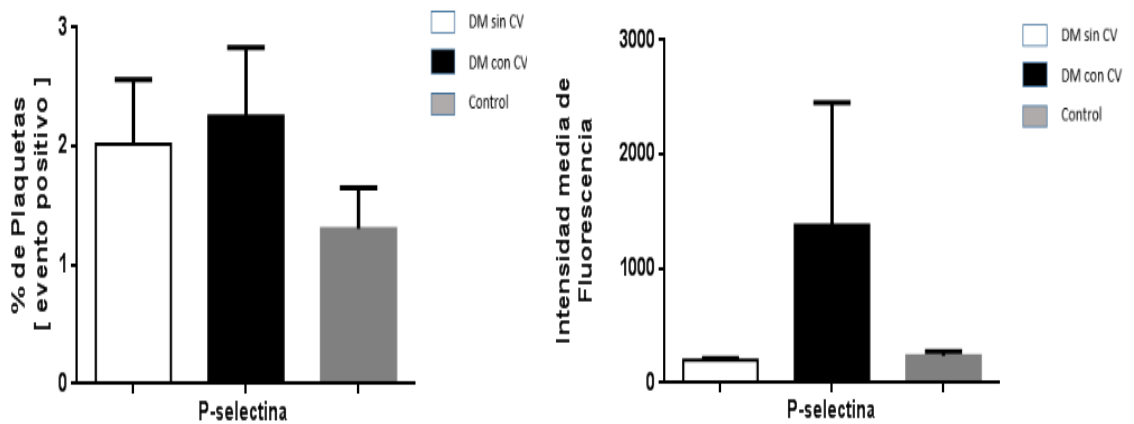


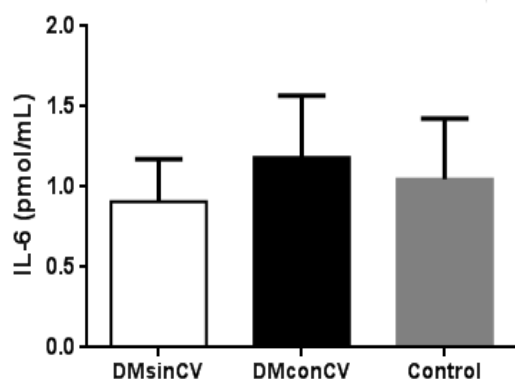
Figura N°11: Citometría de flujo. Panel A: % de plaquetas con evento positivo e IMF con anexina V. **Panel B:** % de plaquetas con evento positivo e IMF con P-selectina. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 20$ para DM con CV; $n = 16$ para DM sin CV; $n = 15$ para Control)

5.7 Marcadores de inflamación y estrés oxidativo

Como se ha descrito anteriormente que los pacientes diabéticos presentan un estado proinflamatorio, hemos determinado los niveles de citoquinas inflamatorias (IL-6 y TNF- α) y de un marcador de estrés oxidativo (AOPP).

En el Figura N°12, en los paneles A y B se muestran los resultados obtenidos para los marcadores inflamatorios. No se encontraron diferencias significativas en estos marcadores, posiblemente debido a que los pacientes se encontraban bajo control hipoglicémico.

PANEL A:



PANEL B:

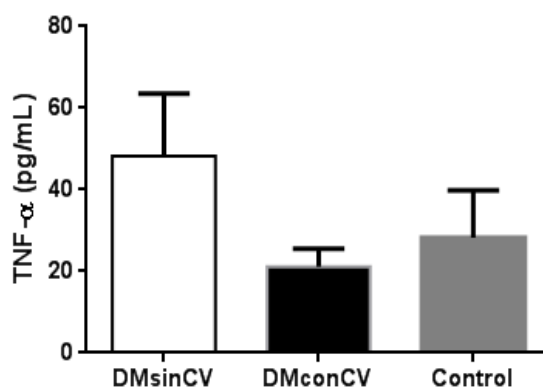


Figura N°12: Marcadores de inflamación. Panel A: Concentración plasmática de Interleuquina 6 (IL-6). **Panel B:** Concentración de TNF- α (Factor de necrosis tumoral α). (n=20 para DM con CV; n=16 para DM sin CV; n=15 para Control)

En la Figura N°13 en relación a los resultados para marcadores de estrés oxidativo (AOPP) se aprecia que los controles sanos tienen un menor

estrés oxidativo que los pacientes diabéticos, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

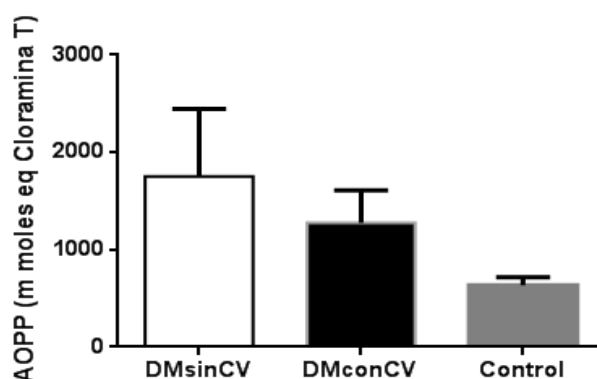


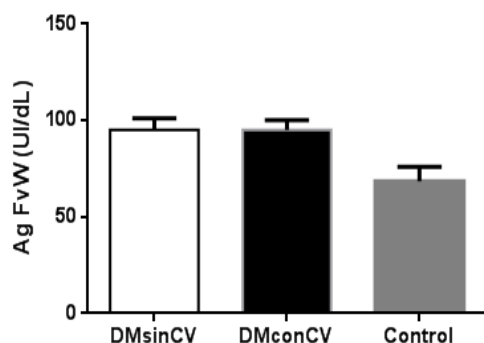
Figura N°13: *Marcadores de estrés oxidativo:* Concentración de AOPP. (n=20 para DM con CV; n=16 para DM sin CV; n=15 para Control)

5.8 Marcadores de daño endotelial

Para evaluar el daño endotelial se determinó la cantidad de Factor von Willebrand (FvW: Ag) y su funcionalidad mediante la prueba de unión a colágeno (PUC) como se muestra en la Figura N°14.

No se observan diferencias significativas cuando se evalúa tanto la cantidad como la funcionalidad del FvW en los tres grupos en estudio.

PANEL A:



PANEL B:

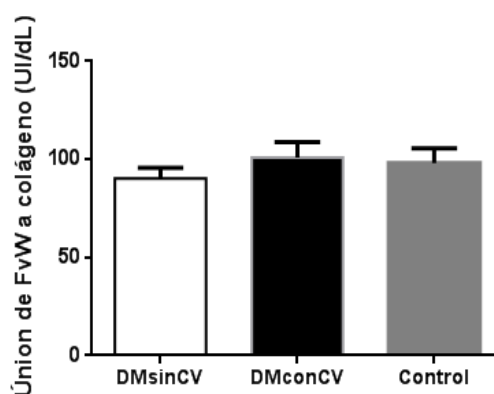


Figura N°14: Marcadores de daño endotelial. Panel A: concentración antígeno FvW plasmático. **Panel B:** Unión de FvW a colágeno (PUC). (n=20 para DM con CV; n=16 para DM sin CV; n=15 para Control)

5.9 Cuantificación de marcadores de enfermedad cardiovascular

Para evaluar la cuantificación de los marcadores de enfermedad cardiovascular se determinó el fibrinógeno plasmático y la PCR ultrasensible. En el Panel A se muestran los niveles de fibrinógeno plasmático que se midió por método de Clauss, en el Panel B se muestran los niveles de hsPCR a través de Elisa para concentraciones bajas de PCR (PCR ultrasensible). No encontramos diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros.

PANEL A:

PANEL B:

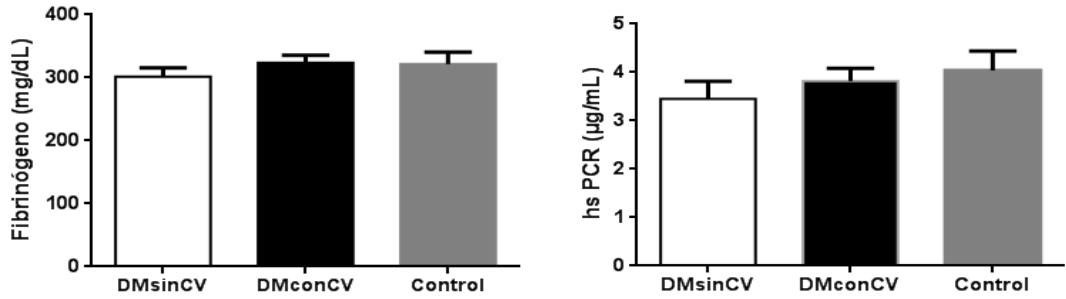


Figura N°15: Panel A: Concentración de fibrinógeno determinada por técnica de Clauss. **Panel B:** Concentración de PCR (Proteína C reactiva). (n=20 para DM con CV; n=16 para DM sin CV; n=15 para Control)

CAPÍTULO N°6: DISCUSIÓN

En esta unidad de investigación estudiamos pacientes con DM tipo II, con CV previos para corroborar si en estos pacientes existe un aumento de la APC-FT plaquetario en comparación con diabéticos sin CV y controles sanos. El aumento de la APC-FT plaquetario podría favorecer el aumento de la hipercoagulabilidad que comúnmente se observa con este tipo de pacientes ⁽⁴⁹⁾.

La gran mayoría de los pacientes de ambos grupos de estudio (con CV y CV) se encontraban al momento de la toma de muestra bajo control glicémico, ya sea con HGO (metformina) y/o insulina. En cuanto al control con estatinas como Atorvastatina o Rosuvastatina, el 95% de los pacientes diabéticos con CV se encontraba bajo tratamiento con estas, mientras que solo el 38% de los pacientes diabéticos sin CV se trataban con este tipo de medicamento (Ver Tabla N°3).

Sabemos que en la DM existe un aumento en los niveles plasmáticos de marcadores de disfunción endotelial, inflamación y de estrés oxidativo ^(27, 34). Nuestro estudio no arrojó diferencias significativas entre los tres grupos, esto probablemente se puede deber a que los pacientes estaban controlados con hipoglicemiantes y además bajo tratamiento con estatinas, las cuales se ha visto que disminuyen la función plaquetaria y los marcadores de inflamación ⁽⁵⁰⁾.

Pese a que los pacientes diabéticos de ambos grupos están controlados se pudo determinar (por medio de marcadores de activación plaquetaria *in vivo*), que los pacientes que sufrieron un CV presentan una reactividad plaquetaria mayor que los pacientes que aún no han sufrido un CV.

Se ha visto anteriormente que en los pacientes diabéticos existe un estado protrombótico, el que se asocia a una alta prevalencia de enfermedad cardiovascular y causa de muerte debido a la hipereactividad plaquetaria que genera una hipersensibilidad a los agonistas plaquetarios. En nuestro estudio por medio de la técnica de generación de trombina no se pudo demostrar esta

reactividad, probablemente debido al uso de hipoglicemiantes y estatinas que pueden alterar la función plaquetaria.

Tampoco se pudo identificar una hipersensibilidad a los agonistas plaquetarios, ya que nuestros resultados en los estudios de agregación y secreción plaquetaria con ADP reflejaron una menor funcionalidad de las plaquetas en los pacientes diabéticos con CV en comparación a los pacientes que aún no sufren un CV. Esto puede deberse a una posible refractariedad de las plaquetas, ya que estas pueden haber sido previamente activadas por un estímulo externo o *ex vivo*, lo que es concordante con los resultados obtenidos en la citometría de flujo.

Para el estudio de función plaquetaria se utilizaron distintos agonistas en dosis sub-umbrales pero solo se observó una disminución significativa de los pacientes con CV en los plaquetas estimuladas con ADP, esto podría deberse a un aporte de ADP por parte de los glóbulos rojos, el cual se puede unir a los receptores de ADP de las plaquetas y hacerlas aún más refractarias. El ADP es una molécula portadora de energía que puede estar presente en todas las células, incluyendo los glóbulos rojos.

Es sabido que los pacientes diabéticos tienen una actividad fibrinolítica disminuida y se han realizado estudios para determinar los mecanismos implicados⁽⁵¹⁾. Nuestros resultados para la determinación del TLC indicaron que los pacientes diabéticos con CV presentan una disminución en su actividad fibrinolítica con respecto a controles normales. Se desconoce la relevancia que tiene la hipofibrinólisis en la generación del CV ya que no existen estudios previos.

En cuanto al punto principal de nuestra investigación, no se observó un aumento significativo en la APC-FT de los pacientes con CV, por el contrario, se encontró una disminución significativa en estos pacientes en la APC-TF con TRAP en relación al grupo control, esto probablemente se puede deber a que el ensayo en *ex vivo* y las plaquetas pueden haberse activado anteriormente.

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) ⁽⁵⁰⁾ disminuye la APC-TF. La Atorvastatina es un medicamento utilizado ampliamente en los pacientes diabéticos, especialmente por nuestro grupo de estudio correspondiente a los pacientes diabéticos con CV , por lo tanto, esta también puede ser la causa de que nuestros resultados no mostraran un aumento significativo en la APC-TF con respecto a los pacientes sin enfermedad cardiovascular.

CAPÍTULO N°7: CONCLUSIÓN

- No se encontró un aumento significativo de la APC-TF plaquetario entre los pacientes con CV en relación a los pacientes sin CV y los controles sanos.
- Se pudo comprobar que los pacientes con CV tienen un aumento en la activación de sus plaquetas que se ve reflejada en una disminución de la reactividad *ex vivo* en las pruebas de laboratorio.
- Se pudo determinar que los pacientes diabéticos con CV presentan una disminución en la actividad fibrinolítica en relación a los controles sanos.
- No encontramos un aumento de los marcadores inflamatorios de los pacientes, probablemente debido a que han sido controlados durante la evolución de su enfermedad o post-CV.

PROYECCIONES:

Para mejorar este estudio y ver si realmente existe una APC-TF plaquetario aumentada en los pacientes diabéticos con CV se sugieren reclutar pacientes que hayan sido recientemente diagnosticados y que no hayan tenido algún tipo de tratamiento.

Además sería conveniente aumentar el número de pacientes reclutados para mejorar la confianza de los test estadísticos utilizados.

CAPÍTULO N°8: REFERENCIAS

1. Alberti K, Zimmet P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*. 1998; 15(7): 539-553.
2. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009; 33 (Supplement 1): S62-S69.
3. World Health Organization [Internet]. 2015. OMS, Diabetes. Disponible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
4. DeFronzo RA. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*. 1999; 131(4): 281-303.
5. Aubert R. *Diabetes in America*. 2° ed. United States: Diane Pub Co; 1995.
6. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson J, Valle T, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *New England Journal of Medicine*. 2001; 344(18): 1343-1350.
7. García F, García F, Modroño M, López J, Novo J, Martínez Á, et al. Guía clínica de diabetes mellitus tipo 2 [Internet]. Fistera. 2015. Disponible desde: <http://www.fistera.com/guias-clinicas/diabetes-mellitus-tipo-2/>
8. Standards of medical care in diabetes 2015. *Diabetes Care*. 2014; 38(Supplement 1): S9.
9. Vásquez D. Estados de hipercoagulabilidad. *Revista Cubana de Hematología e Inmunología y Hemoterapia*. 1997; 13(2): 90-108.
10. Lena A, Raymondo S. Evaluación de inhibidores fisiológicos de la coagulación en pacientes diabéticos tipo 2. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2007; 41(2): 213-218.

11. Albaladejo G, López-Vílchez I, Díaz-Ricart M, Galán A. Interacción entre las plaquetas y el factor tisular: mecanismos e implicaciones patológicas [Internet]. Curso trombosis y hemostasia. 2012. Disponible desde: http://www.cursotrombosisyhemostasia.com/pdf2012/3.%20Interaccion_p_laquetas.pdf
12. Osorioz J, Quenán Y, Borja Gómez W. Evolution and changes in the blood coagulation system. A reflection. *Universidad y Salud*. 2013; 15(2): 225-237.
13. Menéndez E, Rubio S, Sánchez M^aT, Valle T. Visión moderna de la hemostasia: nuevo modelo de coagulación. *Asociación Española de Biopatología Médica*. 2011-2012; 584-611.
14. Baute R, Alfonso T, Salabert L, Águila J, Zamora M. Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares. *Medisur*. 2011; 9(2): 146-155.
15. Tonda R. El complejo factor VIIa - Factor tisular y su papel compensatorio en las disfunciones hemostáticas [Licenciado en Biología]. Universidad de Barcelona; 2007.
16. Krause F. Alteración de la función plaquetaria. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. 2002; 62: 47-49
17. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24(8): 1476-1485.
18. Matadamas-Zárate C, Hernández-Jerónimo J, Pérez-Campos E, Majluf-Cruz A. Alteraciones plaquetarias en la diabetes mellitus tipo 2. *Archivos de Cardiología de México*. 2009; 79: 102-108.
19. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología Suplementos*. 2013; 13: 2-7.
20. Pereira J. La fisiopatología de la hemostasia: Algunos aspectos sobre la vida y muerte de las plaquetas en la circulación [Internet]. Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. 2008. Disponible desde: <http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/20081/Fisiopatologia.pdf>

21. Monteiro M, Martínez M, O'Connor J. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. *Revista de Diagnóstico Biológico*. 2002; 51(3): 87-99.
22. Caunedo P. La citometría de flujo en el estudio de las plaquetas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2004; 20(1).
23. González X, Notario M, Guzmán A. Las plaquetas en la diabetes mellitus. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2001; 17(1): 19-24.
24. Noumura S. Platelet activation markers. *Rinsho Byori*. 2003; 51, 1096–1101.
25. Schneider DJ. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32(4): 525-527.
26. Tabit C, Chung W, Hamburg N, Vita J. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2010; 11(1): 61-74.
27. Cruz J, Licea M, Hernández P, Yanes M, Salvato A. Disfunción endotelial y diabetes mellitus. *Revista Cubana de Endocrinología*. 2012; 23(2): 166-185.
28. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865): 813-820.
29. Aleixandre de Artiano M, Ortega Mateo A. Función y disfunción endotelial. Madrid: Editorial Complutense; 2000.
30. Esper R, Nordaby R, Vilariño J, Paragano A, Cacharrón J, Machado R. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology*. 2006; 5(1): 1-18.
31. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012; 5(1): 9-19.

32. Antoniades C, Tousoulis D, Stefanadis C. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on oxidative stress, inflammatory status, and coronary atherosclerosis: an example of a transient phenotype. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007; 49(11): 1226.
33. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis, C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *The Hellenic Journal of Cardiology*. 2009; 50(5): 402-409.
34. Kalousová M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiological Research*. 2002; 51(6): 597-604.
35. Fuster V, Ibáñez B. Diabetes y enfermedad cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*. 2008; 8(C): 35-44.
36. Zamora A, Marrugat J. Pronóstico de los pacientes diabéticos con cardiopatía isquémica. *Revista Española de Cardiología*. 2002; 55(7): 751-762.
37. González-Maqueda I. La enfermedad coronaria del diabético. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento. *Revista Española de Cardiología*. 2007; 7(H): 29-41.
38. Sena C, Pereira A, Seiça R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2013; 1832(12): 2216-2231.
39. Vicente V, Ordinas A. Factor tisular y colágeno: hemostasia y trombosis. *Haematologica*. 2002; 87(1): 241-257.
40. Muller, I. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *The FASEB Journal*. 2003; 17(3): 476-478.
41. Bogdanov V, Østerud B. Cardiovascular complications of diabetes mellitus: the tissue factor perspective. *Thrombosis Research*. 2010; 125(2): 112-118.
42. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent

- upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *Journal of Experimental Medicine*. 2003; 197(11): 1585-1598.
- 43.** Østerud B, Bjørklid E. Sources of Tissue Factor. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2006; 32(1): 011-023.
- 44.** Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell D, et al. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003; 23(9): 1690-1696.
- 45.** Schwertz H, Tolley N, Foulks J, Denis M, Risenmay B, Buerke M. et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *Journal of Experimental Medicine*. 2006; 203(11): 2433-2440.
- 46.** Panes O, Padilla O, Matus V, Sáez C, Berkovits A, Pereira J, Mezzano D. 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*. 2012; 23(1): 36-44.
- 47.** Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen A, Canteloup S et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure 1, 2. *The Journal of Immunology*. 1998; 16(5): 2524-2532.
- 48.** Macy E, Hayes T, Tracy R. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clinical Chemistry*. 1997; 43(1): 52-58.
- 49.** Gerrits A, Koekman C, van Haeften T, Akkerman J. Platelet tissue factor synthesis in type 2 diabetic patients is resistant to inhibition by Insulin. *Diabetes*. 2010; 59(6):1487-1495.

- 50.** Panes O, Valderas J, Acevedo M, Contreras S, Pereira J, Rigotti A, Mezzano D. 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 protein and clotting activity in hypercholesterolemic patients. *Blood*. 2013; 122(21): 34-34.
- 51.** Hess K, Alzahrani S, Mathai M, Schroeder V, Carter A, Howell G et al. A novel mechanism for hypofibrinolysis in diabetes: the role of complement C3. *Diabetologia*. 2011; 55(4): 1103-1113.

CAPÍTULO N°9: ANEXOS

9.1 Anexo 1: Documentos de consentimiento informado

6

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 Quiñiñir 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 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 Quififir, 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

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
Pacientes con Diabetes Mellitus 2 sin 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 Quiñiñir 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 no ha tenido eventos cardiovasculares**, como un infarto agudo al miocardio. En este caso usted servirá para comparar esta función de las plaquetas con enfermos que si han tenido estos eventos.

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.

- 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.



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 Quiñir, Investigador Responsable del estudio, al teléfono celular 9-61400056, lquinir@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

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
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 Quiñifil 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 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, lrquininir@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 Etico 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

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 _____



9.2 Anexo 2: Certificado de aprobación

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE**
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO - CEC-MED UC

CERTIFICADO DE APROBACIÓN CEC-MEDUC

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