



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**“DETERMINACIÓN DEL ESTADO FIBRINOLÍTICO EN
PACIENTES CON PERITONEODIÁLISIS: RELACIÓN CON
ACTIVACIÓN DE LA COAGULACIÓN E INFLAMACIÓN”**

Unidad de investigación presentada en conformidad a los requisitos para obtener el
Título de Tecnólogo Médico con especialidad en Bioanálisis Clínico,
Inmunohematología y Banco de Sangre.

Autores:

Marcela Andrea Cayuleo Canio

Alejandro Nicolás Rojas Loyola

Mariana de Lourdes Soto Monsalve

Profesor Guía: BQ. Olga Teresa Panes Becerra

Santiago de Chile, 2014

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	7
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	8
1.1 Insuficiencia Renal Crónica.....	8
1.2 PD como tratamiento para IRC	10
1.3 IRC y Riesgo Cardiovascular.....	12
1.4 Inflamación y Fibrinólisis	13
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS.....	16
CAPÍTULO 3: OBJETIVO GENERAL	17
CAPÍTULO 4: OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Tipo de estudio.....	19
5.2 Lugar de realización.....	19
5.3 Población en estudio	20
5.3.1 Toma de muestras:	22
5.3.2 Mediciones bioquímicas y hematológicas:	23
5.4 Variables estudiadas.....	24
5.4.1 Obtención plasma rico en plaquetas y plasma libre de plaquetas	24
5.4.2 Generación de trombina.....	24
5.4.3 Tiempo de lisis de coágulo	26
5.4.4 Agregación y secreción plaquetaria	27
5.4.5 Purificación de plaquetas	299

5.4.6 Marcaje con Anexina V-FITC en plaquetas para Citometría de Flujo ...	300
5.4.7 Marcaje de P-selectina en plaquetas para Citometría de Flujo	30
5.4.8 Proteína C Reactiva ultrasensible	311
5.4.9 Determinación de productos de oxidación avanzada de proteínas	31
5.4.10 Cuantificación de citoquinas (TNF- α e IL-6)	31
5.4.11 Cuantificación del PAI-1	32
5.4.12 Cuantificación de tPA y uPA	32
5.4.13 Determinación del fragmento de protrombina humana F 1+2.....	33
5.4.14 Determinación del complejo trombina/antitrombina III.	33
5.4.15 Cuantificación de la cantidad y función del Factor von Willebrand. ...	344
5.5 Análisis Estadístico	34
5.6. Consentimientos informados.....	35
5.6.1 Consentimiento Informado: Controles Sanos	35
5.6.2 Consentimiento Informado: Pacientes en Peritoneo-Diálisis	38
CAPÍTULO 6: RESULTADOS	41
6.1 Características demográficas de la población	41
6.2 Función Plaquetaria	43
6.3 Marcadores de GT <i>in vivo</i>	45
6.4 Marcador de GT <i>ex vivo</i>	46
6.5 Cuantificación de actividad fibrinolítica.....	48
6.6 Marcadores de inflamación.....	50
6.7 Marcadores de daño endotelial	51
6.8 Marcador de estrés oxidativo	52

6.9: Correlación entre marcadores de inflamación, estrés oxidativo, daño endotelial y actividad fibrinolítica.....	53
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN.....	54
CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1 <i>Definición de ERC</i>	8
TABLA 1.2 <i>Etapas de la ERC</i>	9
TABLA 1.3 <i>Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en la ERC</i>	13
TABLA 5.1 <i>Determinación del factor de cálculo</i>	28
TABLA 5.2 <i>Cálculo de la concentración de 5HT en el control plaquetario y muestras</i>	28
TABLA 6.1 <i>Características demográficas de pacientes en PD y controles</i>	42
TABLA 6.9 <i>Correlación entre marcadores de inflamación, estrés oxidativo, daño endotelial y actividad fibrinolítica</i>	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 <i>Diálisis Peritoneal</i>	10
FIGURA 1.2 <i>Causas de muerte en pacientes en PD</i>	12
FIGURA 5.1 <i>Generación de trombina (thrombinoscope®) en PRP</i>	25
FIGURA 5.2 <i>Curva de formación y lisis del coágulo</i>	26
FIGURA 6.2.1 <i>Agregación y secreción plaquetaria</i>	43
FIGURA 6.2.2 <i>Citometría de Flujo; expresión de P-selectina y Anexina V</i>	45
FIGURA 6.3 <i>Marcadores de GT in vivo</i>	46
FIGURA 6.4 <i>Marcador de GT ex vivo</i>	47
FIGURA 6.5 <i>Determinación de TLC, PAI-1, tPA, uPA</i>	49
FIGURA 6.6 <i>Marcadores de Inflamación; IL-6, usPCR, TNF-α</i>	50
FIGURA 6.7 <i>Marcadores de daño endotelial; Ag FvW y PUC</i>	51
FIGURA 6.8 <i>Marcador de estrés oxidativo AOPP</i>	52

RESUMEN

En Chile existe una alta prevalencia de insuficiencia renal crónica (IRC), con una elevada tasa de mortalidad anual asociada a eventos cardiovasculares. Existe una relación entre los marcadores de inflamación y el desarrollo de estos eventos, inducidos por mediadores como interleuquina 6 (IL-6), citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y estrés oxidativo, sumado al daño de células endoteliales producido por las terapias de reemplazo. Las plaquetas son esenciales tanto en la formación del coágulo al proveer la superficie apta para el ensamblaje de los factores de coagulación como en el aporte de activadores e inhibidores (PAI-1) de la fibrinólisis. Sin embargo, la relación entre el aumento de daño endotelial e inflamación y la actividad fibrinolítica de plaquetas no ha sido estudiado. Este estudio planteó que pacientes con IRC en peritoneodiálisis (PD) presentarían un estado hipofibrinolítico de sus plaquetas. Se estudiaron 25 pacientes con IRC en PD y 25 individuos aparentemente sanos pareados por sexo y edad. En paralelo se estudió: función plaquetaria, actividad procoagulante, marcadores de inflamación, daño endotelial y actividad fibrinolítica de plaquetas (TLC). Se encontró un aumento en la función plaquetaria, en marcadores de actividad procoagulante, inflamación, daño endotelial y estrés oxidativo. En cambio se observó una disminución significativa de la actividad fibrinolítica de plaquetas y la cantidad de tPA plasmático. El TLC-Ris correlacionó significativamente con los niveles de creatinina y con marcadores de estrés oxidativo, inflamación y daño endotelial. La disminución de la capacidad fibrinolítica de pacientes en PD, podría ser parte de la patogenia de la enfermedad y ser un factor de riesgo relevante que explique el aumento de eventos cardiovasculares en IRC.

Palabras claves: IRC, fibrinólisis, inflamación, estrés oxidativo, daño endotelial.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

1.1 Insuficiencia Renal Crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) ha aumentado considerablemente su prevalencia en la población a nivel mundial, constituyendo un problema de salud pública, su manifestación más grave es la insuficiencia renal crónica (IRC).⁽¹⁾

La IRC se define como la presencia de daño renal con una duración igual o mayor a tres meses, caracterizada por anormalidades estructurales o funcionales, con o sin descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) menor 60 mL/min/1,73m².⁽¹⁾ (Tabla N° 1.1).

TABLA N° 1.1: Definición de ERC ⁽²⁾

1. Daño renal con o sin TFG disminuida, definido por:
<ul style="list-style-type: none"> • Marcadores de daño renal: <ul style="list-style-type: none"> a) Anormalidades urinarias anatomo o histopatológicas (albuminuria) b) Anormalidades de imagen renal (riñones poliquísticos) c) Anormalidades sanguíneas (síndromes tubulares renales)
2. TFG < 60 mL/min/1,73 m², con o sin daño renal

En el año 2002, la *National Kidney Foundation* (K/DOQI, 2002) de Estados Unidos propuso la estratificación de la ERC en cinco etapas de evolución, las cuales se basan en la presencia de daño estructural y/o la disminución de la TFG. (Tabla N° 1.2)

TABLA N° 1.2: Etapas de la ERC ⁽²⁾

Etapas	Descripción	TFG (mL/min/1,73m²)
1	Daño renal con TFG normal	>90
2	Daño renal con leve disminución de TFG	60-89
3	Disminución moderada de la TFG	30-59
4	Disminución severa de la TFG	15-29
5	Falla renal	< 15 (o diálisis)

Las etiologías de la ERC son diversas y se pueden agrupar en enfermedades vasculares, glomerulares, túbulo intersticiales, uropatías obstructivas, entre otras.

El resultado de una disminución en la TFG y la pérdida progresiva de la estructura renal secundaria a las distintas causas, evoluciona desde alteraciones bioquímicas hasta un síndrome clínico con repercusión multiorgánica llamado uremia. El síndrome urémico puede originarse por la acumulación de productos del metabolismo de proteínas y/o por alteraciones subsecuentes a la pérdida de la función renal. Existen diversas sustancias tóxicas que intervienen en esta enfermedad, provocando diversas complicaciones que pueden llevar a una enfermedad cardiovascular. Este proceso es mediado por moléculas vasoactivas, proinflamatorias y factores de crecimiento, los cuales conducen a los glomérulos a un estado de hiperfiltración adaptativo. ⁽¹⁾

Actualmente existen diversos tratamientos destinados a mejorar el estado de los pacientes como: hemodiálisis, peritoneodiálisis (PD) y trasplante renal.

1.2 PD como tratamiento para IRC

La PD es un procedimiento depurativo de toxinas, electrolitos y de excreción del exceso de líquido, regulando el medio intra y extracelular. Esta es una alternativa de sustitución renal para los pacientes en IRC etapa 4-5. ⁽³⁾

Según el último estudio de la Sociedad Chilena de Nefrología, existen en el país 18.688 pacientes enfermos renales crónicos que se encuentran en diálisis; 17.598 en hemodiálisis y sólo 1.090 en PD. ⁽⁴⁾

La PD utiliza el peritoneo como membrana de diálisis ya que posee la propiedad de ser semipermeable a líquidos por los poros en los capilares peritoneales y solutos por la difusión mediada por las fuerzas oncóticas. El procedimiento comienza con la inserción de un catéter vía quirúrgica, éste es flexible y de silicón el cual es introducido en un túnel subcutáneo de la pared abdominal peritoneal, donde se infunde una solución de diálisis que permanece un tiempo determinado, realizando el intercambio de sustancias desde la sangre al líquido infundido, eliminando lo tóxico al exterior por el mismo catéter. (Figura N° 1.1) ⁽³⁾

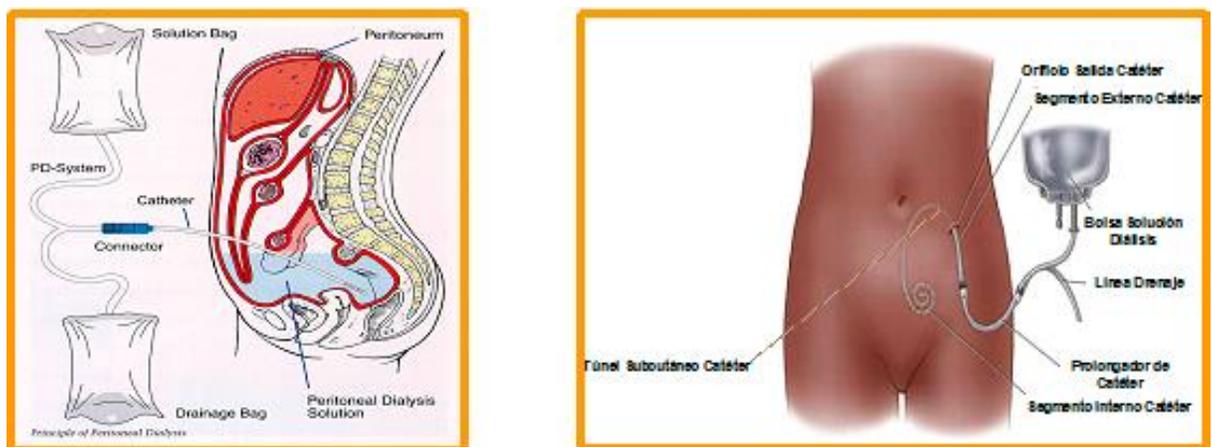


FIGURA N°1.1: Diálisis Peritoneal

El agente osmótico más usado en PD es la glucosa (en forma de dextrosa), al ser una molécula de bajo peso molecular (90-200 Daltons) comercialmente disponible en Chile.

La glucosa no es el agente osmótico ideal debido a que se absorbe fácilmente y produce complicaciones metabólicas severas, como hiperglicemia, hiperinsulinemia y obesidad, que son factores de riesgo cardiovascular en una población que por sí misma tiene un riesgo aumentado de enfermedad cardíaca.

Por lo que existen otros agentes osmóticos, como los aminoácidos y la icodextrina, con una actividad osmótica similar a la glucosa y con un menor riesgo para la membrana peritoneal, sin embargo, no se encuentran disponibles en Chile. ^(1,4)

Existen distintos tipos de PD:

- Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria Manual (DPCA): la persona se encarga de realizar el intercambio tres o cuatro veces al día.
- Diálisis Peritoneal Automatizada (DPA): una máquina denominada cicladora realiza los intercambios automáticamente mientras la persona duerme.

La cantidad de PD depende de la contextura física del paciente, su función renal, salud nutricional, condiciones generales y la prueba de equilibrio peritoneal (PEP), que indica el estado funcional de la membrana peritoneal. ⁽⁵⁾

1.3 IRC y Riesgo Cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad en los pacientes con ERC, con una mortalidad 30 a 40 veces mayor a la observada en la población general en sujetos menores de 40 años. (Figura N°1.2) ⁽⁶⁾

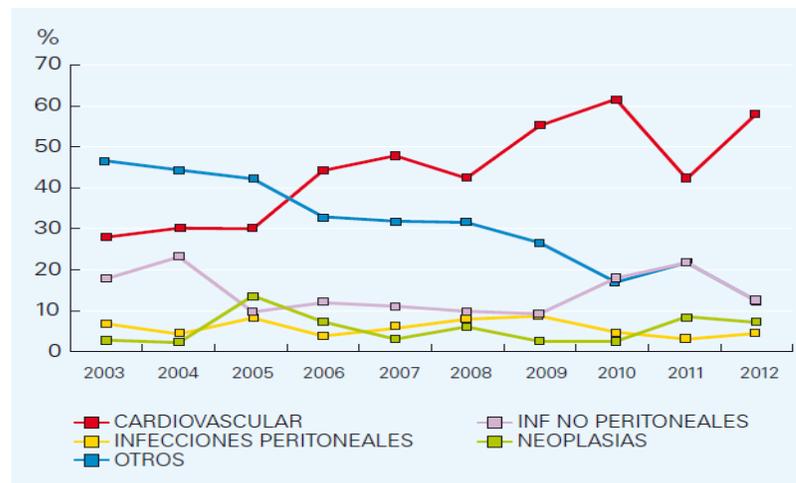


FIGURA N°1.2: Causas de muerte en pacientes en PD ⁽⁷⁾.

Se puede observar que la principal causa de muerte de pacientes en PD corresponde a las enfermedades cardiovasculares con un porcentaje cercano al 60%.

Este riesgo cardiovascular no solamente es atribuible al proceso patológico subyacente como la diabetes mellitus (DM) y la hipertensión arterial (HTA), sino también a la correlación que existe entre uremia y aterosclerosis acelerada ⁽⁸⁾. El aumento del riesgo cardiovascular se asocia a factores de riesgo tradicionales como no tradicionales. (Ver tabla N° 1.3).

Estudios en la población han revelado la existencia de una relación entre la elevación de los marcadores de inflamación y el posterior desarrollo de eventos cardiovasculares. ⁽⁹⁾

TABLA N° 1.3: Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en la ERC ^(1,9)

Tradicional	No tradicionales
DM	Disfunción endotelial
HTA	Estrés oxidativo
Tabaquismo	Inflamación
Dislipidemias	Hipercoagulabilidad

1.4 Inflamación y Fibrinólisis

Los estados de inflamación a baja escala en IRC son denominados “episodios de microinflamación”, los cuales son inducidos por mediadores inflamatorios entre ellos IL-6, TNF- α y factores de crecimiento, estimulados por estrés oxidativo donde se denota una disminución del óxido nítrico (NO), la infección del acceso vascular y/o PD, desencadenando un daño en la pared vascular del endotelio. Estos pacientes evolucionan con niveles plasmáticos elevados de las citoquinas e interleuquinas que inducen a la liberación de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, la cual se correlaciona directamente con el daño endotelial e indirectamente con la función renal residual. ⁽⁹⁾

El NO es una de las sustancias más importantes liberadas por el endotelio al actuar como un vasodilatador, inhibir el crecimiento y la inflamación, además de tener efectos antiagregantes en plaquetas. Debido a esto la reducción del NO contribuye a la trombogenicidad y la severidad de los eventos cardiovasculares. Por lo tanto, la

disfunción endotelial con aumento de estrés oxidativo y la expresión de moléculas de adhesión, como por ejemplo la molécula soluble de adhesión intracelular (sICAM-1) contribuye no sólo a la iniciación, sino también a la progresión de la formación de placa aterosclerótica. Se ha demostrado que la gravedad de la disfunción endotelial tiene valor pronóstico en eventos cardiovasculares y su corrección está asociada con la reducción del riesgo. ^(10, 11)

Posterior a la coagulación y transcurridas 48 a 72 horas continúa el proceso de disolución del coágulo, remodelación del vaso sanguíneo y restauración del flujo vascular, este proceso se denomina fibrinólisis y está comandada por la plasmina, que es una enzima proteolítica que degrada el polímero de fibrina en pequeños fragmentos que son eliminados por el sistema monocítico-macrofágico. Ésta se forma por la conversión del plasminógeno a través de activadores como el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA).

El sistema fibrinolítico posee inhibidores, siendo uno de los principales el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), el cual inhibe el tPA y el uPA. ⁽¹²⁾

El PAI-1 se produce normalmente en cantidades de trazas en los riñones sanos, pero se sintetiza en una gran cantidad en pacientes con enfermedad renal; un estudio realizado indicó que los pacientes con TFG <60 mL/min/1,73m² presentaron un 6,5% más de PAI-1 en comparación con los sujetos con TFG > 90 . ⁽¹³⁾

Citoquinas como el TNF- α e IL-6 estimulan la expresión de PAI-1. Esta sobreexpresión de PAI-1 se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular e infarto al miocardio debido a la inhibición de la fibrinólisis. ^(12,14)

Las plaquetas cumplen un rol esencial en la coagulación sanguínea, ya que no sólo proveen la superficie apta para el ensamblaje de los factores de la coagulación, sino que poseen factor tisular (FT), el iniciador de la cascada de la coagulación. ⁽¹⁵⁾

Plaquetas contienen en sus gránulos una gran cantidad de PAI-1, además de uPA y su receptor uPAR ⁽¹⁶⁾, por lo que participarían no sólo en la etapa de formación del coágulo sino que también en la disolución de éste.

Estudios previos han mostrado la existencia de una estrecha relación entre la cantidad de trombina generada y la resistencia de coágulos a la fibrinólisis, sin embargo, la relación entre el aumento de la actividad procoagulante de las plaquetas y su participación en la fibrinólisis no ha sido estudiada.

En este estudio se plantea que los pacientes con IRC en PD presentarían un estado hipofibrinolítico, el que se correlacionaría con el aumento de la reactividad plaquetaria, además de los marcadores de inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial, que aumentaría el riesgo de enfermedad cardiovascular.

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS

En los pacientes con insuficiencia renal crónica en peritoneodiálisis existe una disminución de la capacidad fibrinolítica de las plaquetas.

CAPÍTULO 3: OBJETIVO GENERAL

Relacionar la actividad fibrinolítica de las plaquetas de pacientes en peritoneodiálisis con marcadores de activación de la coagulación e inflamación.

CAPÍTULO 4: OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la función plaquetaria en plasma rico en plaqueta de los pacientes en PD y controles.
2. Evaluar lisis del coágulo en plasma rico en plaquetas activadas con agonistas plaquetarios, de los pacientes en PD y controles.
3. Evaluar marcadores de inflamación (TNF- α , IL-6, usPCR) en el plasma de los pacientes en PD y controles.
4. Medir marcadores de estrés oxidativo en el plasma de los pacientes en PD y controles.
5. Medir marcadores de disfunción endotelial en el plasma de los pacientes en PD y controles.
6. Correlacionar el tiempo de lisis del coágulo con la inflamación.
7. Correlacionar el aumento de la actividad plaquetaria con lisis del coágulo en plasma rico en plaquetas y marcadores fibrinolíticos.

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

Estudio de Investigación Clínico, del tipo caso control.

5.2 Lugar de realización

Esta Unidad de Investigación fue realizada en el Laboratorio de Trombosis y Hemostasia, Departamento de Hematología-Oncología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Este estudio fue financiado por el proyecto de investigación FONDECYT N°1130853. (*Neo-Síntesis Constitutiva de Proteínas por Plaquetas Humanas: Alcances Fisiopatológicos y Clínicos Distintivos*).

5.3 Población en estudio

Pacientes

Se reclutaron 25 pacientes con IRC (15 mujeres y 10 hombres) en tratamiento de PD, los cuales fueron seleccionados y derivados por la Dra. Mireya Ortiz, Jefa de la Unidad de Diálisis Peritoneal de Red Salud UC - Christus.

Criterios de inclusión:

- Pacientes que se encontraban en tratamiento de PD.
- Firma de consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación.

Criterios de exclusión:

- Pacientes cuya causa de IRC fuese nefrosis.
- DM.
- Hipercolesterolemia.
- Embarazadas.
- Consumo de drogas que afecten la función plaquetaria 7 días antes del estudio.
- Enfermedades concomitantes o infecciones

Controles

Se reclutaron 25 individuos (15 mujeres y 10 hombres), correspondientes a los controles normales, los cuales fueron pareados por sexo y edad con los pacientes en estudio.

Criterios de inclusión:

- Individuos aparentemente sanos.
- Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Hipercolesterolemia.
- Afecciones renales.
- Creatinina elevada.
- DM.
- Embarazadas.
- Consumo de drogas que afecten la función plaquetaria 7 días antes del estudio.
- Enfermedades concomitantes o infecciones.
- Tratamiento con estatinas.

5.3.1 Toma de muestras:

Pacientes

La toma de muestra se realizó previo ayuno de 8–12 horas. La extracción de sangre venosa periférica se llevó a cabo por un profesional encargado de la toma de muestra, con aguja de 19 G (para evitar activación plaquetaria).

Se recolectaron:

- 1 tubo con gel separador y acelerante de la coagulación para perfil bioquímico y perfil lipídico.
- 1 tubo con fluoruro de sodio para la determinación de glicemia.
- 1 tubo con EDTA para hemograma y recuento plaquetario.
- 4 tubos con citrato de sodio, volumen 4,5 mL, concentración 3,2%: 2 tubos para generación de trombina y tiempo lisis del coágulo y 2 tubos para P-Selectina por citometría de flujo y secreción plaquetaria.
- 2 tubos de 10 mL, con 2 mL de anticoagulante ACD (dextrosa 2,4 % p/v, citrato de sodio 2,2 % p/v), para lavado de plaquetas, generación de FXa y AxV.

Controles

La toma de muestra se realizó previo ayuno de 8–12 horas. La extracción de sangre venosa periférica se llevó a cabo por un profesional encargado de la toma de muestra, con aguja de 19 G (para evitar activación plaquetaria).

Se recolectaron:

- 1 tubo con gel separador y acelerante de la coagulación para perfil bioquímico y perfil lipídico.
- 1 tubo con fluoruro de sodio para la determinación de glicemia.
- 1 tubo con EDTA para hemograma y recuento plaquetario.
- 4 tubos con citrato de sodio volumen 4,5 mL, concentración 3,2%: 2 tubos para generación de trombina y tiempo lisis del coágulo. 2 tubos para P-Selectina por citometría de flujo y secreción plaquetaria.
- 2 tubos de 10 mL, con 2 mL de anticoagulante ACD para lavado de plaquetas, generación de FXa y AxV.

5.3.2 Mediciones bioquímicas y hematológicas:

Las determinaciones que se realizaron a los pacientes y controles fueron enviadas y posteriormente procesadas en el Laboratorio Clínico central Red Salud UC-CHRISTUS.

5.4 Variables estudiadas

5.4.1 Obtención plasma rico en plaquetas y plasma libre de plaquetas

La sangre se recolectó en tubos con anticoagulante citrato de sodio 3,2%. Se centrifugaron a baja velocidad a 150g por 8 minutos a temperatura ambiente, para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Luego se rescató y traspasó cuidadosamente el sobrenadante correspondiente al PRP a otro tubo. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación de los tubos con el plasma restante a alta velocidad 1.500g por 8 minutos a temperatura ambiente.

Siguiendo con el procedimiento se volvió a rescatar y traspasar nuevamente sólo el sobrenadante correspondiente al plasma pobre en plaquetas (PPP) a tubos Eppendorf. Por último se realizó una nueva centrifugación a los tubos Eppendorf con el PPP a 11.000g por 5 minutos. Finalmente se obtuvo el sobrenadante que corresponde al plasma libre de plaquetas (PLP).

5.4.2 Generación de trombina

La generación de trombina (GT) se realizó usando la técnica descrita por Hemker *et al* ⁽¹⁷⁾, la cual es una modificación de ésta, ya que se utilizó PRP activado previamente en el Agregómetro PAP-8 (Biodata Corporation, USA) con suero fisiológico (SF),

ristocetina (Ris) (1,2 mg/mL) y péptido activador del receptor de trombina (TRAP) (10 μ M).

Se utilizaron placas de microtitulación para fluorescencia y un sustrato fluorogénico en Fluorimetro (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific). El equipo realiza una cinética de fluorescencia durante 60 minutos, según el programa Thrombinoscope® IM BU.

Parámetros de medición de 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.
- Medición: nM/min.

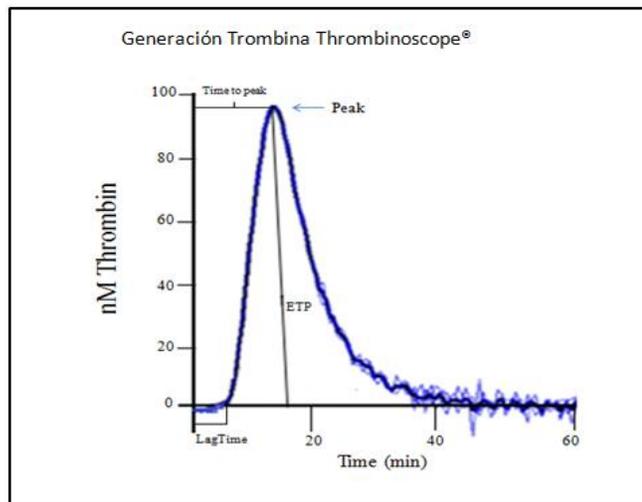


FIGURA 5.1. Generación de trombina (thrombinoscope®) en PRP.

Modificación del trabajo de Panes y cols. ⁽¹⁷⁾

5.4.3 Tiempo de lisis de coágulo

El tiempo de lisis de coágulo (TLC) es una técnica que evalúa la actividad fibrinolítica global en plasma y en este caso se modificó para evaluar la participación de las plaquetas en la fibrinólisis. ⁽¹⁸⁾

Se cargaron 100 μ L de la muestra en duplicado en placas de microtitulación. El PRP se estimuló con agonistas plaquetarios, como Ris (1,2 mg/mL) y TRAP (24 μ M). En breve, se le incorporó cloruro de calcio (7,5 mM) para formar el coágulo y tPA (91 ng/mL) para acelerar la fibrinólisis.

Toda esta reacción creada en la placa es medida usando el lector de microplacas (Multiskan FC Thermo Fisher Scientific), éste utiliza la técnica turbidimétrica cinética que registra la absorbancia (Abs) a 405nm, referencia 620nm, cada 1 minuto durante 3 horas a 37 °C en constante agitación y lectura continua de densidades ópticas cada 60 segundos durante 180 minutos.

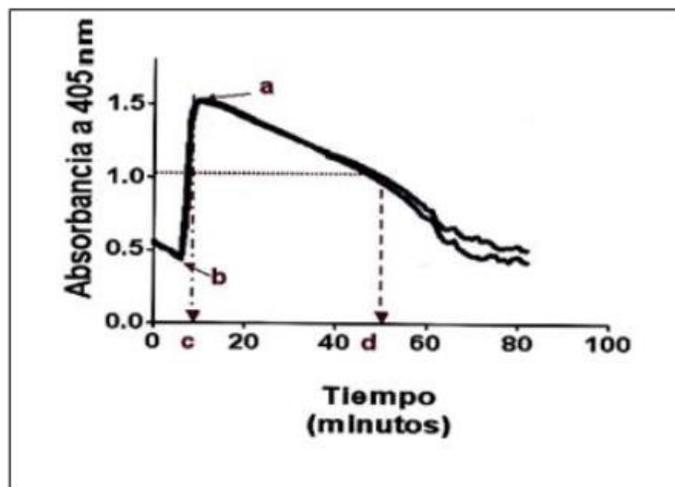


FIGURA 5.2: *Curva de formación y lisis del coágulo.*

- a) Máxima de Abs
- b) Abs basal
- c) Tiempo en que se alcanza el máximo de Abs
- d) Tiempo en que se obtiene la mitad del máximo de turbidez.

TLC= (d-c) min, TLC razón normalizada = TLC muestra/TLC Pool Normal.

5.4.4 Agregación y secreción plaquetaria

Para este ensayo se utilizó un Agregómetro PAP-8 (Biodata Corporation), donde se midieron y analizaron los cambios de transmitancia de una suspensión de plaquetas (PRP) estimuladas con concentraciones sub-umbrales de agonistas plaquetarios; Araquidonato de sodio (AA) (1mM), Epinefrina (EPI) (0,5 μ M), Adenosin difosfato (ADP) (0,5 μ M), Colágeno (Col) (0,5 μ g/mL) y Ris (1,2 mg/mL). En este instrumento, una fuente energética emite luz a 650 nm, la cual incide sobre cada microtubo, cuyo contenido se encuentra en agitación constante y a 37 °C.

La acción de estos agonistas, eventualmente, causa su agregación. Esta agregación plaquetaria permite que el paso de la luz incidente a través del PRP (% transmitancia) sea mayor. Se registró el paso de la luz durante 5 minutos, a medida que se va produciendo el aclaramiento óptico.

Posteriormente, se determinó la secreción de serotonina intraplaquetaria (5HT) a través del ensayo de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Waters e2695) acoplado a un detector electroquímico (HPLC-ED) (Waters2465).⁽¹⁸⁾

TABLA 5.1: Determinación del factor de cálculo.

$$F = \frac{\left(\text{Concentración Calibrador 5HT} \left(\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) * \text{Área Peak EI en Calibrador} \right)}{\text{Área peak 5HT en Calibrador}}$$

5HT: 100 ng/mL; EI: Estándar Interno 50 µg/mL.

Con el Área y la concentración de la solución calibradora de 5HT (ng/mL) se determina el factor de cálculo (F).

TABLA 5.2: Cálculo de la concentración de 5HT en el control plaquetario y muestras.

$$5HT \left(\frac{\text{ng}}{\text{Plaquetas } 10^9} \right) = \frac{\frac{\text{Área 5HT}}{\text{Área EI}} (\text{muestra}) * F \left(\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right)}{\text{Rec plaquetario} (* 10^9 \text{ pq}) * \text{Vol PRP inicial (mL)}}$$

Pq: plaquetas

5.4.5 Purificación de plaquetas

Se obtuvieron muestras de sangre completa por punción venosa en el antebrazo en tubos Falcon de 15 mL con solución anticoagulante ACD-A (dextrosa 0,13 M, citrato de sodio 0,085 M) conteniendo prostaglandina E1 (PGE-1) (1 μ M) y teofilina (12 mM), en relación 1/5 de ACD-A/sangre completa.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 200 g por 9 min a 4 °C. El PRP se recuperó en tubos de plástico de 10 mL y se centrifugó a 1.500 g por 9 min a 4 °C.

El pellet de la centrifugación a 1.500 g se resuspendió en buffer Tyrode de lavado (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 12 mM, Na₂HPO₄ 0,35 mM, BSA 1 %, glucosa 5,5 mM, PGE-1 0,056 μ M, pH 6,2). Luego se centrifugó 2 veces a 200 g por 9 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante y eliminando el pellet en cada ocasión. A continuación se centrifugó a 1.500 g por 9 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer Tyrode de lavado. Luego se centrifugó a 130 g por 5 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se realizó recuento de plaquetas en contador Coulter Z1.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1.500 g por 9 min a 4 °C y se reconstituyeron en buffer Tyrode con calcio (NaCl 121 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaHPO₄ 0,4 mM, BSA 1 %, glucosa 5,5 mM, pH 7,4), llevando a una concentración de 6×10^5 plaquetas/ μ L.

5.4.6 Marcaje con Anexina V-FITC en plaquetas para Citometría de Flujo

El marcaje de plaquetas con Anexina V (AxV) isotiocianato de fluoresceína (FITC) para el análisis mediante citometría de flujo en (Accuric 6 Beckton), se realizó en plaquetas purificadas en condiciones basales.

Como marcador de activación, se utilizó la unión de AxV-FITC para identificar fosfolípidos aniónicos de la membrana plaquetaria, los cuales son expuestos por productos de procesos de activación.

En este estudio se utilizó como marcador de plaquetas un anticuerpo monoclonal anti CD61-PE, el cual tiene actividad anti Glicoproteína IIIa (GP IIIa).

5.4.7 Marcaje de P-selectina en plaquetas para Citometría de Flujo

El marcaje de la proteína P-selectina en plaquetas (CD62P) para posterior análisis mediante citometría de flujo, se realizó en PRP en condición basal.

Como marcador de activación de plaquetas, se utilizó anti CD62P-PE para identificar la glicoproteína P-selectina, la cual se expresa en los gránulos alfa y luego se expone en la membrana externa plaquetaria por activación de ésta. ⁽¹⁹⁾

5.4.8 Proteína C Reactiva ultrasensible

La cuantificación de Proteína C Reactiva ultrasensible (usPCR) en PLP se realizó mediante técnica ELISA competitivo ⁽²⁰⁾. Variable cuantitativa, que mide cantidad de PCR expresado en $\mu\text{g/mL}$.

5.4.9 Determinación de productos de oxidación avanzada de proteínas

Técnica colorimétrica que se utilizó para cuantificar los niveles de productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP) presentes en PLP.

Variable cuantitativa, donde la cantidad de productos de oxidación presentes en plasma son expresados en mmoles equivalentes de cloramina T. ^(21,22)

5.4.10 Cuantificación de citoquinas (TNF- α e IL-6)

La técnica que se utilizó para la detección y cuantificación de TNF- α , fue un ELISA sándwich comercial (*eBiosciences, Austria*). Corresponde a una variable cuantitativa, donde la cantidad de color producido es directamente proporcional a la cantidad de TNF- α presente en la muestra ⁽²³⁾. La concentración de TNF- α es expresado en pg/mL .

La IL-6 se determinó por técnica de ELISA sándwich comercial (*eBiosciences, Austria*).

5.4.11 Cuantificación del PAI-1

La técnica que se utilizó para la detección y cuantificación del PAI-1, fue un ELISA sándwich comercial (*Aniara, USA*). La cantidad de color generado es directamente proporcional a la cantidad de PAI-1 presente en la muestra. La concentración de PAI-1 es expresada en ng/mL.

5.4.12 Cuantificación de tPA y uPA

La técnica que se utilizó para la detección y cuantificación de tPA antigénico fue un ELISA sándwich comercial (*Aniara, USA*). La cantidad de color generado es directamente proporcional a la cantidad de tPA presente en la muestra. La concentración de tPA es expresada en ng/mL.

Además se determinó la concentración de uPA por técnica de ELISA sándwich comercial (*Aniara, USA*). La intensidad de color generado es directamente proporcional a la concentración de uPA en el plasma. La concentración de uPA es expresada en ng/mL.

5.4.13 Determinación del fragmento de protrombina humana F 1+2.

Técnica inmunoenzimática basada en el principio de sándwich para la determinación *in vitro* del fragmento de protrombina humana F 1+2 (Behring). La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de F1+2 se determina fotométricamente. La concentración es expresada en pmol/L.

5.4.14 Determinación del complejo trombina/antitrombina III.

Técnica inmunoenzimática basada en el principio de sándwich para la determinación *in vitro* del complejo trombina/antitrombina III humana (TAT) (*Affinity Biological, Canadá*). La intensidad del color resultante, proporcional a la concentración de TAT, se determina fotométricamente.

5.4.15 Cuantificación de la cantidad y función del Factor von Willebrand.

Técnica ELISA modificada de tipo directo para cuantificar los niveles de concentración de Factor Von Willebrand (FvW) ⁽²⁴⁾. ELISA modificado para la cuantificación de actividad de FvW, por unión a colágeno (PUC).

5.5 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el software GraphPad Prism 6. Se determinó la distribución de los datos, promedios, desviación estándar (SD), error estándar (ES), coeficiente de correlación (r). Los valores obtenidos se consideraron estadísticamente significativos con un $p < 0,05$. Los modelos estadísticos utilizados para analizar los datos obtenidos fueron el test de Mann Whitney y la matriz de correlaciones de Pearson.

5.6. Consentimientos informados

5.6.1 Consentimiento Informado: Controles Sanos

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

(Controles Sanos). Versión 20 de Mayo, 2014

Nombre del Proyecto:	Neo-Síntesis Constitutiva de Proteínas por Plaquetas Humanas: Alcances Fisiopatológicos y Clínicos Distintivos”.
Sigla Protocolo:	“Actividad del Factor Tisular Plaquetario en la Uremia”
Patrocinador del Estudio / Financiamiento Investigador Responsable:	CONTROLES SANOS Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (FONDECYT). Proyecto Regular 1130853 Escuela de Medicina, P. Universidad Católica de Chile Diego A. Mezzano Abedrapo Fonos 02 354 3774 – 02 354 3776 Hematología-Oncología.
Depto	



El propósito de esta información es ayudarlo 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. Este estudio está siendo financiado por FONDECYT y la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, y las pruebas de laboratorio no tienen costo para Ud.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

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**.

El propósito de este estudio es evaluar la participación de las plaquetas (células circulantes que están relacionadas con la formación de coágulos) en los mecanismos de formación de estos coágulos y su posterior disolución. Las plaquetas producen sustancias que permiten la formación del coágulo, otras que participan en su disolución y otras que facilitan la cicatrización y curación de las heridas. En algunas personas puede haber aumento o disminución de alguna de estas funciones, lo que causaría una tendencia anormal a las hemorragias o a su opuesto, la formación de coágulos dentro de los vasos sanguíneos. También queremos estudiar el efecto del colesterol alto en la sangre sobre la función de las plaquetas y si un cambio en la frecuencia de administración de la aspirina, que inhibe las plaquetas, mejora su efecto protector de infartos. También, estudiaremos en pacientes en diálisis si las plaquetas aumentan su actividad procoagulante. Además, queremos diseñar una nueva técnica para medir la función de secreción de las plaquetas, y para ello requerimos estudiar plaquetas normales, como creemos son las suyas.

PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Ud. debe venir al Laboratorio de Hemostasia y Trombosis ubicado en Portugal 61, 1er piso, para donar alrededor de 60cc de sangre por única vez (3/4 de taza chica de café, distribuida en un máximo de 8 tubos de tamaños variables) al Investigador Responsable Dr. Diego Mezzano o a alguno de los co-investigadores del proyecto arriba citado. La

extracción de las muestras de sangre es igual que para cualquier examen de laboratorio clínico y el procedimiento demora alrededor de 10 minutos.

Su sangre será usada para efectuar los exámenes descritos en el proyecto (pruebas de función plaquetaria, de coagulación y de fibrinólisis, perfil bioquímico, hemograma) y se realizará una extracción de DNA a partir de ella, para realizar algunos estudios sobre genes relacionados con proteínas de la coagulación y la fibrinólisis (disolución del coágulo). Sus muestras de sangre no se usarán en otros estudios de naturaleza genética posteriores, y si, por alguna razón fuera necesario hacer otras determinaciones, le solicitaremos un nuevo consentimiento voluntario.

Las muestras ya utilizadas son eliminadas de inmediato o se conservan hasta el fin del proyecto de investigación, que dura hasta Marzo del año 2017. Durante el estudio, las muestras de sangre estarán bajo la custodia del Investigador Principal, Dr. Diego Mezzano y de la Co-Investigadora BQ Olga Panes. 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.

Ud. no tendrá beneficio médico o de salud, dada su condición de individuo sano. Cualquier anomalía en alguno de los exámenes efectuados le será comunicada, con recomendación de consulta o no a quien Ud. considere médico de su confianza y elección.

RIESGOS.

La extracción de sangre de una vena puede producir dolor en el sitio de la punción, moretón y muy raramente infección.

COSTOS.

Todo lo relacionado con estos exámenes y su participación en el proyecto no tendrá costo económico para Ud.

COMPENSACIONES.

En el evento que Ud. sufra alguna complicación derivada del muestreo de sangre, será atendido de inmediato por el médico a cargo del proyecto, sin costo para Ud. Varios de los exámenes que se harán en el contexto del proyecto se usan en los chequeos rutinarios de salud y sirven para descartar o sospechar algunas enfermedades.

CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN.

La información obtenida será confidencial, contenida en una carpeta bajo custodia del Dr. Diego Mezzano. Sólo la Co-Investigadora BQ Olga Panes, que actúa coordinando el proyecto, podrá acceder a la información. Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su nombre, RUT, foto o cualquier dato identificatorio no será proporcionado a nadie ajeno al proyecto.

VOLUNTARIEDAD.

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria. Usted tiene el derecho a rechazar participar o a retirar su consentimiento y de esta investigación cuando Ud. así lo desee. Si usted retira su consentimiento, sus muestras serán eliminadas y la



información obtenida no será utilizada. Si por motivos de seguridad es necesario que analicemos sus datos obtenidos hasta ese momento, lo haremos asegurando su confidencialidad.

PREGUNTAS.

Si tiene preguntas acerca de esta investigación médica puede contactar o llamar al Dr. Mezzano, Investigador Responsable del estudio, al teléfono 02 354 3774 o al 02 3543776.

Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede llamar a la Dra. Beatriz Shand K., Presidente del Comité de Ética Científico de la Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, al teléfono 354-8173, o al mail: 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 (o a mi hijo/hija, familiar o representado) de ella en el momento que lo desee.

Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado a hacerlo.

No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.

Se me comunicará de toda nueva información relacionada con esta investigación que surja durante el estudio y que pueda tener importancia directa para mi condición de salud.

Se me ha informado que tengo el derecho a re-evaluar mi participación según mi parecer.

Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

FIRMAS

.....
Nombre Participante	Firma	Fecha
.....
Nombre Investigador	Firma	Fecha
.....
Director de la institución o su delegado.	Firma	Fecha

El Paciente o Control aceptó voluntariamente firmar este Consentimiento, no encontrándose con incapacidad psíquica o intelectual alguna al concurrir con su firma.

.....
Fecha

.....
Firma Investigador Principal



5.6.2 Consentimiento Informado: Pacientes en Peritoneo-Diálisis

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

(Pacientes en Peritoneo-Diálisis). Versión 20 de Mayo, 2014

Nombre del Estudio:	Neo-Síntesis Constitutiva de Proteínas por Plaquetas Humanas: Alcances Fisiopatológicos y Clínicos Distintivos”.
Sigla Protocolo:	Actividad de Factor Tisular Plaquetario en Insuficiencia Renal Crónica. PACIENTES.
Patrocinador del Estudio / Fuente Financiamiento	Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (FONDECYT) N° 1130853. Escuela de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.
Investigador Responsable:	Diego A. Mezzano Abedrapo. Fonos 02 354 3774 – 02 354 3776
Depto/UDA	Hematología-Oncología.



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. Este estudio está siendo financiado por FONDECYT y la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Este estudio pretende esclarecer si en los pacientes con insuficiencia renal crónica, enfermedad que Ud. padece, las plaquetas circulantes tienen participación en la activación de la coagulación observada en ellos. La activación de la coagulación se relaciona con la aparición de trombosis, por ej., infarto cerebral o cardíaco.

PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.

A Ud se le extraerá una muestra de 60 cc de sangre (equivalente a $\frac{3}{4}$ partes de una taza de café chica, distribuidos en tubos de diferentes tamaños) en la Unidad de Diálisis previo a someterse al procedimiento de peritoneo diálisis. Para este estudio, Ud debe contar con la autorización de su médico tratante, y los resultados serán comunicados por escrito en forma completa, oportuna y directa por alguno de los Investigadores a él cuando concluya el análisis de sus muestras y la totalidad del estudio.

La extracción de las muestras de sangre es la habitual en laboratorios clínicos. Su sangre será usada para efectuar los exámenes descritos en el proyecto (pruebas de función plaquetaria, de coagulación y de fibrinólisis, perfil bioquímico, hemograma). De la muestra se sacará ADN para estudiar variantes de proteínas plaquetarias eventualmente relacionadas a la función de las plaquetas. Este ADN no se utilizará en otras investigaciones. Las muestras son utilizadas sólo durante el periodo de la investigación, y

serán eliminadas al término del proyecto, en Marzo 2017. La muestra obtenida, no se usará para estudios de naturaleza genética posteriores. Durante el estudio, las muestras de sangre estarán bajo la custodia del Investigador Principal, Dr. Diego Mezzano y de la Co-Investigadora BQ Olga Panes. Si por el avance del conocimiento en este tema fuera necesario hacer otros exámenes que los descritos, se le solicitará al paciente un nuevo consentimiento voluntario informado. Además, Ud tiene derecho a solicitar el resultado de sus exámenes y conocer las implicancias respecto a su salud, informadas por su médico tratante.

BENEFICIOS

Esta investigación no tiene beneficio personal inmediato. Sin embargo, si los resultados finales de este estudio son positivos, los enfermos como Ud podrían tener un tratamiento más seguro y efectivo.

RIESGOS.

La extracción de sangre de una vena puede producir dolor local por el pinchazo, ocasionalmente moretones en el sitio de punción, y muy raramente infección local. En su caso, se aprovechará la misma punción que se efectuará al comienzo de la diálisis.

COSTOS.

Su participación en esta investigación no tiene costo económico para Ud..

COMPENSACIONES.

En el evento que Ud sufra alguna complicación derivada del muestreo de sangre, será atendido/a de inmediato por el médico a cargo del estudio sin costo para mí.

Todos los exámenes complementarios que se harán son sin costo para mí.

CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN.

La información obtenida se mantendrá en forma confidencial. La información obtenida será totalmente confidencial, contenida en una carpeta bajo custodia del Dr. Diego Mezzano. Sólo la Co-Investigadora BQ Olga Panes, que actúa coordinando el proyecto, podrá acceder a la información. Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su nombre, RUT, foto o cualquier dato identificadorio no será proporcionado a nadie ajeno al proyecto.

VOLUNTARIEDAD.

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria. Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento de esta investigación cuando así lo desee, sin afectar el tratamiento que Ud. recibe de su médico. Si usted retira su consentimiento, sus muestras serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.

PREGUNTAS.

Si tiene preguntas acerca de esta investigación médica puede contactar o llamar al Dr. Mezzano, Investigador Responsable del estudio, al teléfono 02 354 3774 o al 02 3543776.



03/06/2014

CAPÍTULO 6: RESULTADOS

6.1 Características demográficas de la población

Para este estudio se analizaron las muestras de un total de 25 pacientes IRC en PD, de los cuales 23 cumplieron con los criterios de inclusión, en paralelo se estudiaron 23 individuos aparentemente sanos, correspondientes a los controles, los cuales fueron pareados por sexo y edad.

La tabla 6.1 muestra los datos demográficos de ambas poblaciones en estudio. Se muestra el promedio \pm error estándar, el análisis estadístico se realizó con test-t no pareado con significación $p < 0,05$.

Los pacientes en PD presentaron una disminución estadísticamente significativa en su hematocrito y hemoglobina. Y aumento en los niveles de creatinina y triglicéridos.

TABLA 6.1: Características demográficas de pacientes en PD y controles.

	Controles (n=23)	PD (n=23)	p
Edad (años)	46,52 ± 2,86	47,09 ± 2,87	Ns
Hombre/Mujer	9/14	9/14	Ns
Plaquetas (x10³/mm³)	242,9 ± 9,04	241,5 ± 15,62	Ns
Hematocrito (%)	40,35 ± 1,54	32,09 ± 1,15	****
Hemoglobina (mg/dL)	14,10 ± 0,25	10,58 ± 0,37	****
Glucosa (mg/dL)	86,87 ± 1,921	87,70 ± 2,867	Ns
TFG (mL/min/1,73m²)	>60	6,13 (2-17)	
Creatinina (mg/dL)	0,76 ± 0,03	10,66 ± 1,10	****
Colesterol total (mg/dL)	186,0 ± 8,85	182,4 ± 8,30	Ns
Triglicéridos (mg/dL)	111,1 ± 13,55	150,2 ± 15,07	*
LDL (mg/dL)	111,3 ± 6,18	107,4 ± 6,95	Ns
HDL (mg/dL)	52,61 ± 3,11	44,96 ± 2,69	Ns

Los resultados se presentan como promedio ± error estándar. ns: no significativo

(* p< 0,05; ****p< 0,0001).

6.2 Función Plaquetaria

En la figura 6.2.1, se muestran los resultados obtenidos para la función plaquetaria utilizando concentraciones sub-umbrales de agonistas para evidenciar un aumento en la reactividad plaquetaria, en **A** se muestra la agregación plaquetaria determinada como el área bajo la curva de agregación (AUC) y en **B** el porcentaje de secreción de 5HT, determinada por ensayo de HPLC acoplado a HPLC-ED, al activar las plaquetas con los agonistas plaquetarios.

Los resultados muestran que los pacientes en PD presentan un aumento significativo de agregación plaquetaria con AA, EPI y ADP, no así con Col o Ris.

El análisis secreción plaquetaria mostro un aumento significativo en plaquetas estimuladas por ADP.

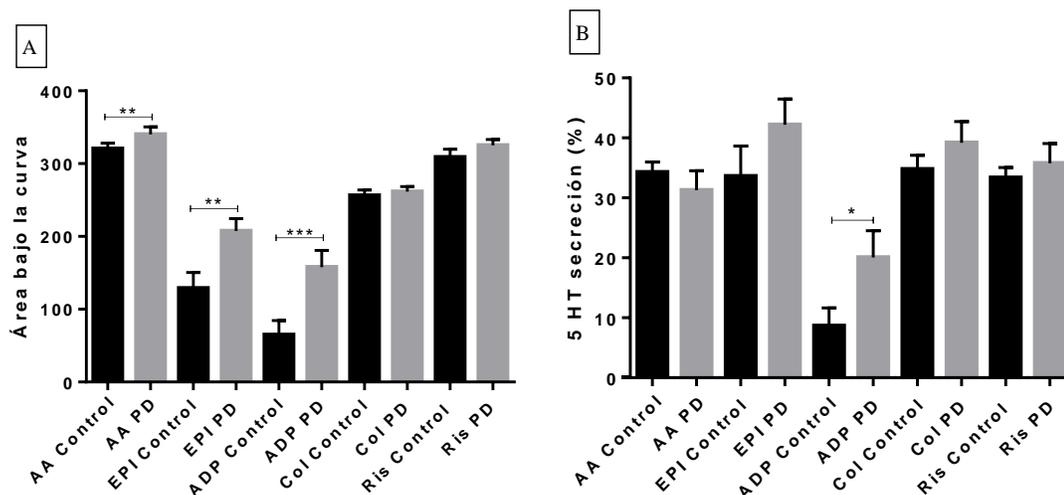


FIGURA 6.2.1: Agregación y secreción plaquetaria.

En A, agregación plaquetaria. Se grafica el Área bajo la curva obtenida al activar las plaquetas con agonistas plaquetarios, en pacientes en PD y controles.

En B, Secreción de serotonina. Se grafican los valores expresados en porcentaje de serotonina secretada según el agonista plaquetario. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Se estudió mediante citometría de flujo la expresión de marcadores de activación en la superficie plaquetaria. Como se observa en la figura 6.2.2, en **A**, se graficó el porcentaje de expresión de CD62P, esta proteína se encuentra contenida en los gránulos alfa plaquetarios y frente a estímulos es expuesta sobre la membrana plaquetaria. Las plaquetas en estado basal no presentan diferencia estadísticamente significativa en la expresión de esta proteína.

Otro marcador de activación plaquetaria que se determinó, fue la exposición del fosfolípido Fosfatidilserina, mediante la marcación de AxV- FITC. Las plaquetas al activarse exponen fosfolípidos aniónicos que son traslocados desde la cara interna de la membrana hacia la cara externa, este fenómeno de “flip-flop” crea una membrana plaquetaria procoagulante necesaria para activar al FT y desencadenar así la coagulación. Como se observa en la figura 6.2.2 en **B**, las plaquetas en estado basal o no estimuladas (N-E) no presentan diferencia estadísticamente significativa entre pacientes en PD y controles.

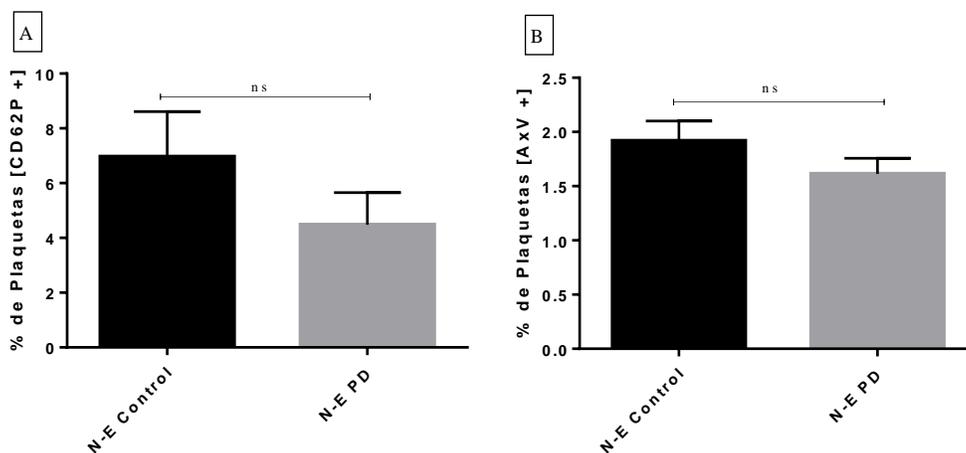


FIGURA 6.2.2: Citometría de Flujo; expresión de P-selectina y Anexina V.

En A, se observa la expresión de CD62P. En B, expresión de Fosfatidilserina mediante marcador Anexina V-FITC. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar. N-E: no estimulado; ns: no significativo.

6.3 Marcadores de GT *in vivo*

Para determinar si los pacientes en PD poseen un aumento de su estado procoagulante se analizó como marcador de GT *in vivo*, dos marcadores de generación de trombina: fragmentos F1+2 que se gráfica en la figura 6.3 en **A** y el complejo TAT en **B**.

Al activarse la protrombina, esta sufre un corte proteolítico lo que genera los fragmentos F 1+2 y trombina en igual proporción. Luego la trombina generada puede ser inhibida por la antitrombina III, formándose el complejo TAT.

El complejo F1+2 esta aumentado significativamente en PD con respecto a los controles, no así el complejo TAT. La discrepancia entre ambos marcadores, puede deberse a que la antitrombina III no es el único inhibidor de la trombina, existiendo por ejemplo la α 2 Macroglobulina inhibidor directo de trombina.

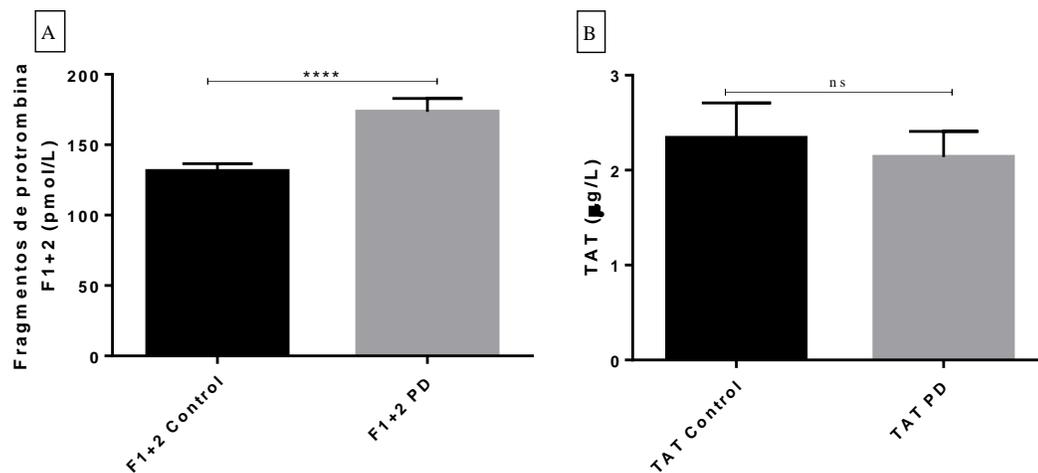


FIGURA 6.3 Marcadores de GT in vivo.

En A, fragmentos F1+2 y en B, complejo TAT. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar. ns: no significativo. (**** $p < 0,0001$).

6.4 Marcador de GT ex vivo

Teniendo como antecedentes que la progresión de la IRC se complica por la hiperreactividad plaquetaria y que esta pudiera estar ayudando al desarrollo de la aterosclerosis avanzada y eventos protrombóticos, se determinó si los pacientes en PD tienen un aumento en su capacidad de generar trombina, en especial la capacidad de las plaquetas, estimuladas con agonistas plaquetarios, para generar trombina a partir de su FT.

Para ello se evaluó la generación de trombina en PRP estimulado Ris y TRAP, análogo de la trombina y se analizaron dos parámetros, el ETP y el Vi.

El análisis del ETP no presentó una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes en PD y controles, en cambio el Vi mostró una disminución significativa en PD respecto al grupo control. Esto indica que los pacientes en PD poseen la misma potencialidad de generar trombina que controles, sin embargo, la velocidad con que generan esta trombina está disminuida. Los datos se muestran en la figura 6.4 en A y B respectivamente.

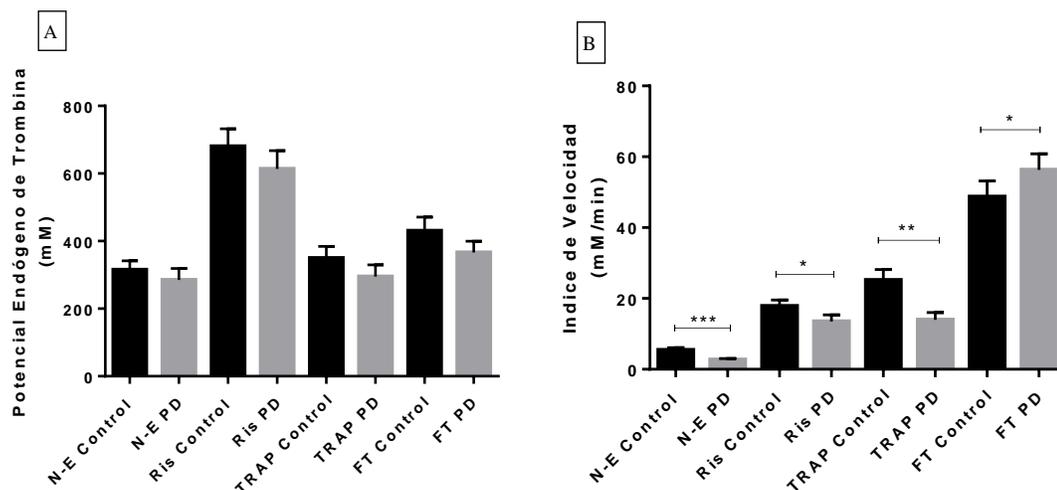


FIGURA 6.4: Marcador de GT *ex vivo*.

En A, ETP y en B, Vi. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

6.5 Cuantificación de actividad fibrinolítica

Se cuantificó la actividad fibrinolítica de pacientes en PD y controles mediante el TLC, que es una técnica global en que las plaquetas son estimuladas con agonistas plaquetarios. Esta medición tiene una muy buena correlación con los niveles plasmáticos del inhibidor de la fibrinólisis PAI-1.

Se encontró mediante esta técnica una actividad fibrinolítica disminuida de los pacientes en PD en relación a controles en plaquetas activadas con ristocetina, figura 6.5 en **A**.

Al cuantificar la cantidad de PAI-1 antigénico mediante ELISA en el sobrenadante obtenido tras realizar la técnica de TLC, se observa una diferencia significativa entre pacientes en PD y controles, figura 6.5 en **B**.

La determinación de tPA antigénico mostró que los pacientes en PD presentan una cantidad menor de tPA versus los controles, figura 6.5 en **C**, sin embargo, pese a que la determinación de uPA antigénico, figura 6.5 en **D**, presenta una tendencia descendente en pacientes en PD, ésta no es estadísticamente significativa.

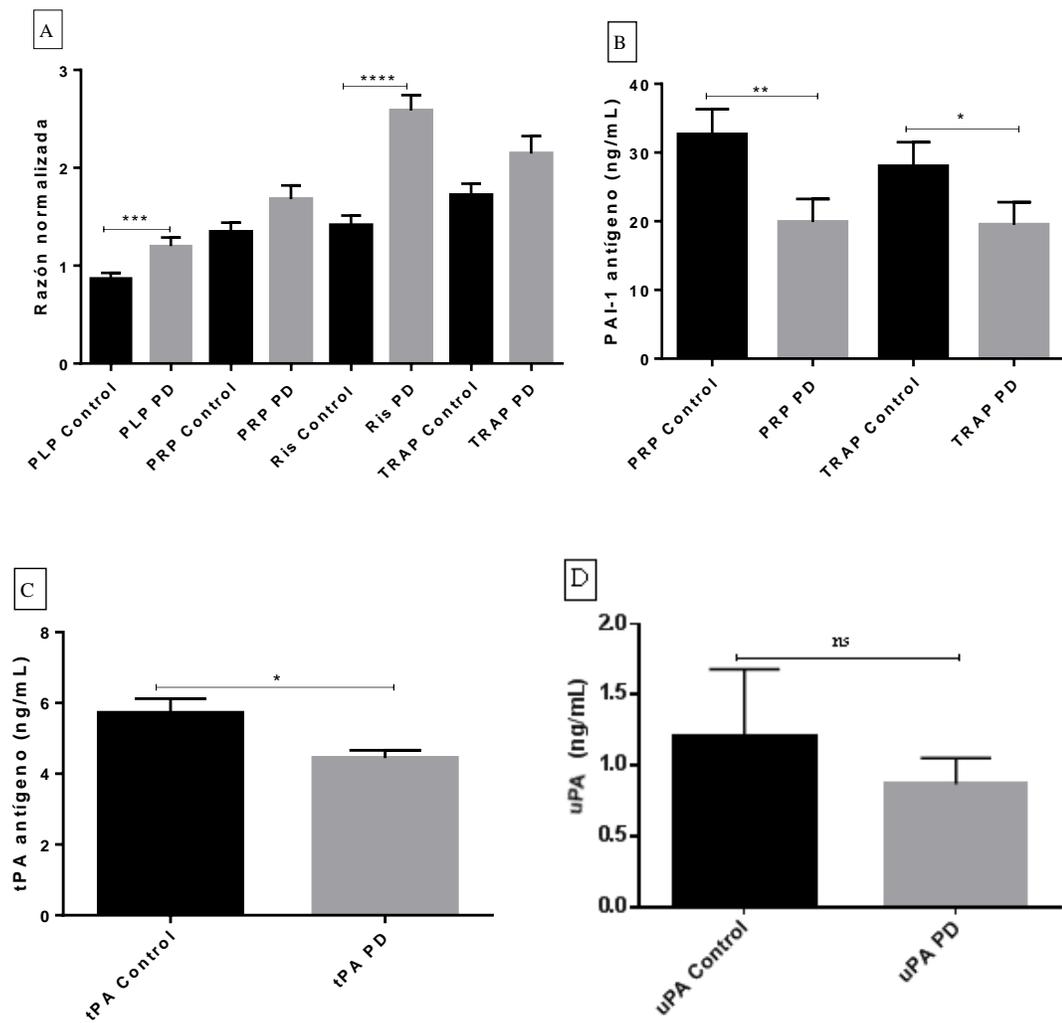


FIGURA 6.5: Determinación de TLC, PAI-1, tPA y uPA. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

6.6 Marcadores de inflamación

La IRC se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria, para confirmar este estado se determinaron los niveles de usPCR y citoquinas inflamatorias TNF- α e IL-6 mediante ELISA. En la figura 6.6 se puede apreciar que tanto en la IL-6, TNF- α y usPCR los pacientes en PD presentan una mayor concentración en comparación a los controles.

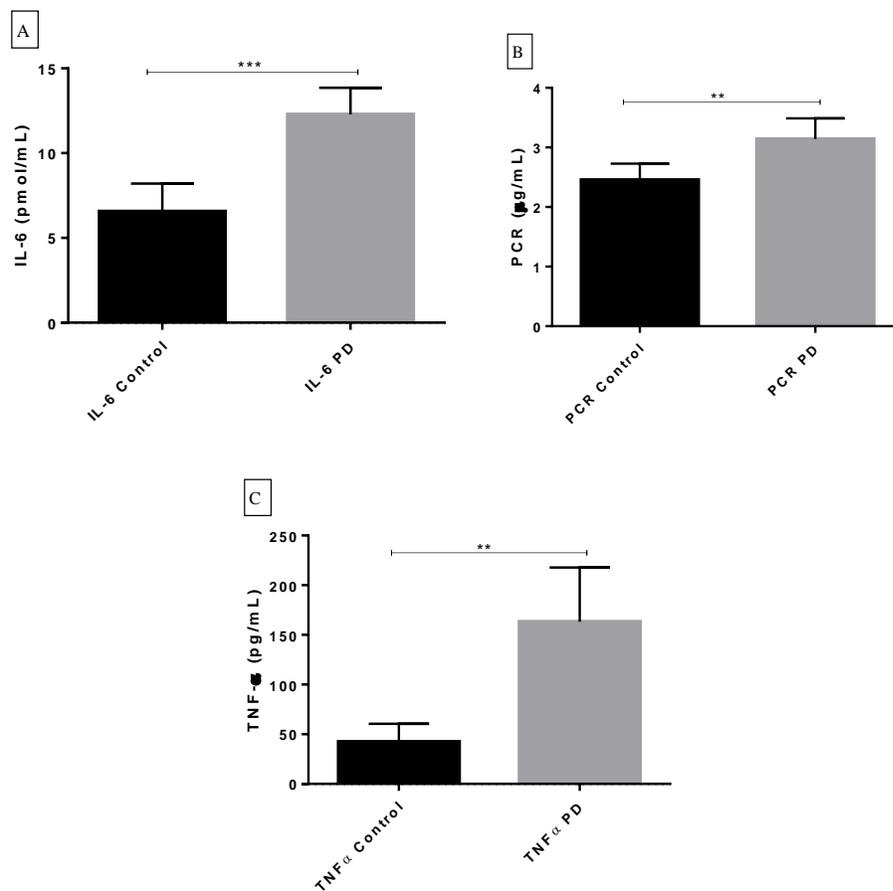


FIGURA 6.6: Marcadores de Inflamación; IL-6, us PCR, TNF- α .

En A, concentración de IL-6. En B determinación de usPCR. En C, concentración de TNF- α . Se presentan los resultados como promedio \pm error estándar. (**p<0,01; ***p<0,001).

6.7 Marcadores de daño endotelial

Se midió mediante un ELISA directo la concentración de FvW como marcador de daño endotelial y su actividad mediante la prueba de unión a colágeno (PUC). Se encontró que en los pacientes en PD existe un aumento significativo de FvW en comparación a los controles, lo que indicaría un mayor daño endotelial.

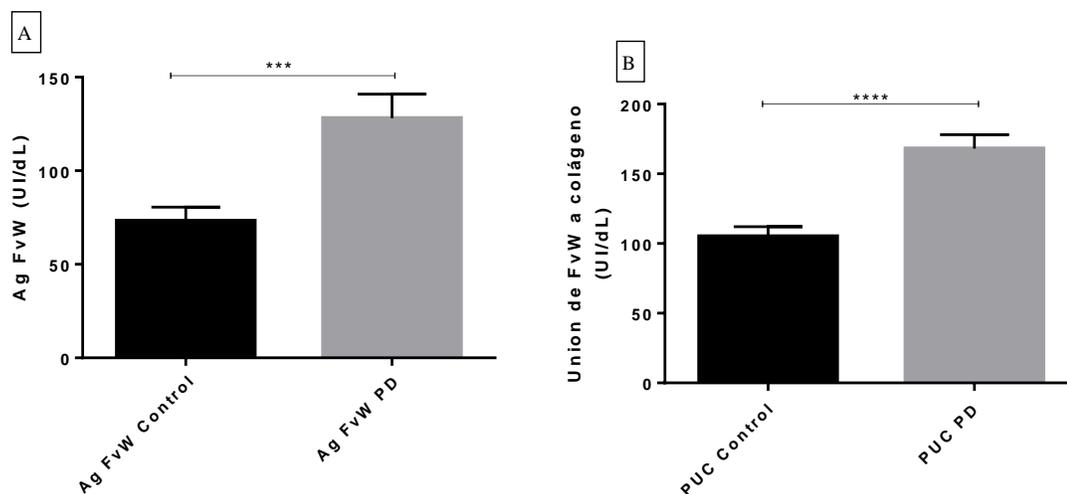


FIGURA 6.7: Marcadores de daño endotelial: Ag FvW y PUC.

En A cuantificación de la concentración de FvW antigénico. En B Funcionalidad del FvW, mediante su unión a colágeno en plasma. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar (**p<0,001; **** p<0,0001).

6.8 Marcador de estrés oxidativo

Considerando que los pacientes que se encuentran en PD presentan un mayor estrés oxidativo y que éste se relaciona con la progresión de la IRC, se determinó un la concentración de AOPP.

Se encontró que los pacientes en PD presentan mayor cantidad de AOPP, lo que indica que presentan un mayor estrés oxidativo que los controles.

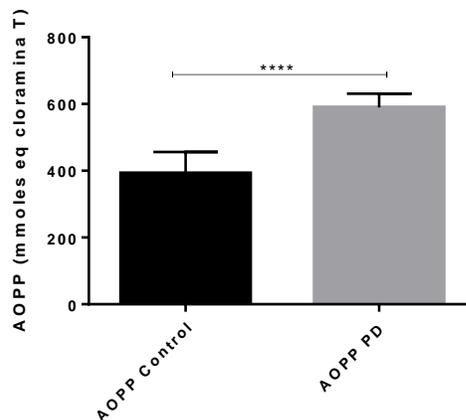


FIGURA 6.8: Marcador de estrés oxidativo AOPP

Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar. (**** $p < 0,0001$).

6.9: Correlación entre marcadores de inflamación, estrés oxidativo, daño endotelial y actividad fibrinolítica.

Se realizó estudio estadístico de correlación con un test estadístico no paramétrico (test de Spearman), encontrando correlaciones significativas, entre los parámetros de TLC-Ris y estrés oxidativo, además de los marcadores de inflamación y daño endotelial.

Estos resultados indican que existe un mayor tiempo de lisis del coágulo en pacientes que presentan niveles aumentados de creatinina, triglicéridos, de marcadores de daño endotelial, inflamación y estrés oxidativo.

TABLA 6.9: Correlación entre marcadores de inflamación, estrés oxidativo, daño endotelial y actividad fibrinolítica.

v/s	TLC-Ris R	p
Creatinina	0,521	$1,429 \times 10^{-5}$
Triglicéridos	0,322	0,01
FvW	0,443	0,002
PUC	0,434	0,001
AOPP	0,552	$7,077 \times 10^{-5}$
UsPCR	0,514	$3,031 \times 10^{-4}$

Análisis con test no paramétrico de Spearman

CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN

En este estudio se reclutaron pacientes con IRC en tratamiento de PD, en los cuales se ha demostrado la presencia de un aumento en el riesgo de sufrir eventos trombóticos y enfermedades cardiovasculares, explicado principalmente por un aumento de su estado inflamatorio y una mayor actividad procoagulante.

La disminución de la actividad fibrinolítica, también se ha asociado a un aumento en el riesgo de eventos cardiovasculares, sin embargo, en pacientes con IRC en PD, no ha sido evaluada, por tanto se propuso estudiar el estado fibrinolítico de estos pacientes con especial énfasis en la participación de plaquetas en este proceso.

Estudios previos han demostrado que un aumento en la función plaquetaria asociadas a condiciones patológicas, llevan a disfunciones tromboembólicas. Es así como en el presente estudio se confirmó en pacientes con IRC en PD un aumento en la función plaquetaria determinada como aumento de su agregación y secreción plaquetaria utilizando concentraciones subumbrales de agonistas plaquetarios, lo que indica que los pacientes presentan una hiperreactividad en sus plaquetas.

Plaquetas, en condiciones basales de obtención de las muestras, no mostraron un aumento significativo de la expresión de P-selectina o AxV, lo que indicaría que las plaquetas no son activadas *in vivo*, sino que son más reactivas a la estimulación con agonistas plaquetarios. Probablemente, esta hiperreactividad plaquetaria esté dada por el daño oxidativo o por activación de células endoteliales, la cuales podrían provocar un cebado de plaquetas, que permite una baja en los umbrales de activación de éstas.

Se confirmó el aumento en los marcadores de estrés oxidativo dado por un aumento significativo en los niveles de AOPP y daño endotelial por un aumento estadísticamente significativo en los niveles y actividad de FvW y un aumento en el estado pro inflamatorio determinado por un incremento en los niveles de usPCR, TNF- α e IL-6 en los pacientes con IRC. El aumento de estos marcadores de inflamación, provocarían modificaciones en la pared endotelial, generando una disfunción de ésta.

Estos pacientes pese a encontrarse en tratamiento de reemplazo (PD) para su función renal, poseen niveles de creatinina aumentados, lo que favorece aún más el estrés oxidativo y manteniendo el daño endotelial.

El estudio de GT en PRP, no arrojó resultados esperados, ya que las plaquetas de pacientes con IRC en PD presentan un potencial de generar trombina similar a controles y una menor velocidad de generación de trombina, comparada con controles normales. Probablemente en la generación de trombina *ex vivo* intervengan otros factores que no hemos evaluado.

Otro marcador de generación de trombina, *in vivo*, es el fragmento F1+2 en plasma, generado en una relación uno a uno con trombina y que se encontró significativamente aumentado en pacientes en relación a controles. Sin embargo, otro marcador de actividad procoagulante *in vivo* el complejo TAT, no mostró diferencias, esto podría deberse a que estén actuando otros inhibidores directos de la trombina como α -2 macroglobulina, α -1 antitripsina, α -2 antiplasmina y el cofactor II de la heparina sobre ella.

La actividad fibrinolítica determinada mediante la técnica de TLC en plasma y PRP activado con Ris, mostró un aumento significativo de la razón normalizada en pacientes con respecto a controles denotando una disminución de actividad fibrinolítica o hipofibrinólisis.

Se determinó la cantidad de los activadores del plasminógeno en plasma (tPA y uPA), encontrando una disminución significativa en los niveles de tPA de los

pacientes, en cambio la cuantificación de uPA no mostró una disminución significativa, aunque podemos observar la misma tendencia que en el tPA.

La disminución de los niveles plasmáticos de estos activadores de plasminogeno, podrían indicar un consumo de estos, lo que provocaría una pobre disolución de coágulos formados en circulación.

El TLC activado con Ris mostró correlación significativa con los niveles de creatinina plasmática, de FvW antigénico y función, los niveles de AOPP y niveles de trigiceridos, lo que indica una disminución de la capacidad fibrinolítica de las plaquetas asociados al aumento de los niveles de creatinina, marcador de disfunción renal, que se asocia a un mayor nivel de estrés oxidativo que dañaría y activaría células endoteliales que provoca el aumento de los niveles de FvW.

Esta asociación entre daño endotelial y la IRC, estaría asociado a una disminución de la capacidad fibrinolítica de las plaquetas.

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES

1. Se corrobora que pacientes en PD presentan un mayor estrés oxidativo, microinflamación, daño endotelial, hiperreactividad plaquetaria y aumento de la actividad procoagulante.
2. Pacientes en PD presentan una disminución de la capacidad fibrinolítica de sus plaquetas, determinada por un TLC prolongado que se correlaciona directamente con los niveles de triglicéridos e inversamente con los niveles de los activadores de la fibrinólisis.
3. La disminución de la actividad fibrinolítica en pacientes con IRC en PD, podría ser parte de la patogenia de estos pacientes y causa del aumento en el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. López M. (2010). Enfermedad renal crónica y su atención mediante tratamiento sustitutivo en México; *Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México*, 1, 1-46.
2. K/DOQI. (2002). Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. *Am J Kidney Dis*, 39.
3. Ortiz AM, Castillo A, Fierro A, Elgueta L, Coter A, Lagomarsino E, Contreras M, Troncoso P, Díaz C, Letelier M, Morales R, Muñoz N. (2010). Guía Clínica Diálisis Peritoneal; *Ministerio de Salud*; 1-94.
4. Zuñiga C. (2014). Nefrología Online. Enfermedad Renal Crónica; Una Epidemia Silenciosa. *Sociedad Chilena de Nefrología*.
5. National Kidney Foundation. (2007). Diálisis Peritoneal: lo que necesitas saber: 1-24.
6. Jara A. (2012). Vascular calcifications in patients with chronic renal disease. *Revista Médica, Clínica Las Condes*, 23 (6): 715-723.
7. Poblete H. (2012). Cuenta de hemodiálisis crónica en Chile. *Sociedad Chilena de Nefrología*, 1-127.

8. Fort J. (2005). Chronic renal failure: A cardiovascular risk factor. *Kidney International*, 68: S25–S29.
9. Orozco R, Benavente D. (2005). La insuficiencia renal crónica como nuevo factor de riesgo cardiovascular. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 16 (5): 13–18.
10. Gad MZ, El-Mesallamy HO, Sanad EF. (2008). hsCRP, sICAM-1 and TAFI in hemodialysis patients: Linking inflammation and hypofibrinolysis to cardiovascular events. *Kidney Blood Pressure Research*, 31 (6): 391–397.
11. Endemann DH, Schiffrin EL. (2004). Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15 (8): 1983–1992.
12. Małgorzewicz S, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. (2013). Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology. *International Journal of Molecular Medicine*, 31 (3): 503-510.
13. Dubin R, Cushman M, Folsom AR, Fried LF, Palmas W, Peralta CA, Wassel C, Shlipak MG. (2011). Kidney function and multiple hemostatic markers: cross sectional associations in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *BMC Nephrology*, 12: 3.
14. Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, Blanchet B, Dumaine R, Gianetti J, Payot L, Weisel JW, Montalescot G. (2006). Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26 (11): 2567-2573.

15. Panes O, Matus V, Sáez C, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. (2007). Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood*, 109 (12): 5242-5250.
16. 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.
17. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. (2012). Thrombin generation: What have we learned?. *Blood Reviews*, 26 (5): 197-203.
18. Olivola E, Pierantozzi M, Imbriani P, Liguori C, Stampanoni Bassi M, Conti M, D'Angelo V, Biagio N, Stefani A. (2014). Serotonin impairment in CSF of PD patients without an apparent clinical counterpart; *PLoS One*; 9 (7): e101763.
19. Caunedo P. (2004). La citometría de flujo en el estudio de las plaquetas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 20 (1).
20. Macy EM, Hayes TE, 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.
21. Gutiérrez I, Domínguez A, Acevedo J. (2003). Fisiopatología del síndrome urémico. *Revista Hospital General Dr. Manuel Gea González*, 6 (1): 13-24.

22. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Cappeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. (1998). Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Journal of Immunology*, 161 (5): 2524-2532.
23. Wilms H, Claasen J, Röhl C, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. (2003). Involvement of benzodiazepine receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases: evidence from activated microglial cells in vitro. *Neurobiology of Disease*, 14 (3): 417-424.
24. Siekmann J, Turecek PL, Schwarz HP. (1998). The determination of von Willebrand factor activity by collagen binding assay. *Haemophilia*, 4 (3):15-24.