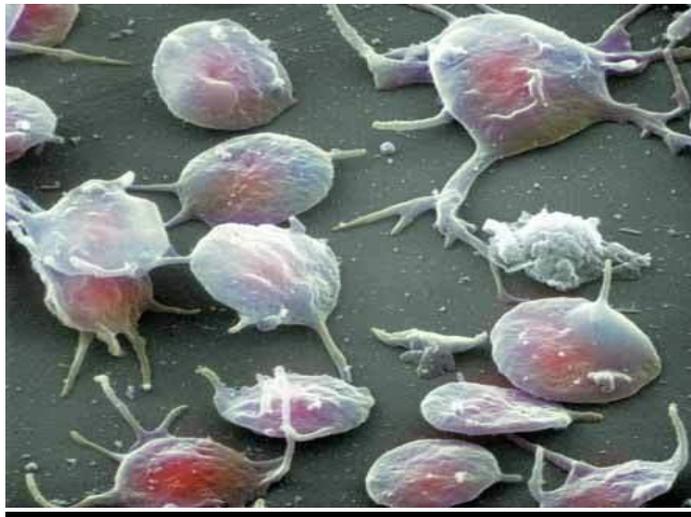


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
ÁREA BIOLOGIA – SUBÁREA GENÉTICA

TESIS DE MAESTRÍA



“Selectina P como marcador de activación plaquetaria y predictor de riesgo cardiovascular: ventajas y limitaciones. Contraste de sus dos isoformas por citometría de flujo y ELISA”

Lic. Gerardo Romanelli González

Orientadora: Dra. Adriana Mimbacas

Co-orientador: Dr. Gustavo Folle

Grupo Genética Humana, Departamento de Genética, IIBCE
Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo, IIBCE
Departamento Neurobiología Celular y Molecular, IIBCE

A mi padre.

Agradecimientos:

- Al programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) de la Universidad de la República (UdelaR), en cuyo marco académico se desarrolló la siguiente Tesis de Maestría.
- A Laboratorios Roemmers, por tener una visión de aplicación práctica inmediata y su donación económica.
- A la Dra. Adriana Mimbacas, orientadora de esta Tesis, por aceptar dicha responsabilidad y estar siempre dando el impulso necesario para la realización de la misma.
- Al Dr. Gustavo Folle, co-orientador de esta Tesis, por asumir dicha responsabilidad y tener siempre la palabra justa, así como la solución precisa para los problemas metodológicos.
- A los miembros del tribunal: Dra. Emilse Bermejo, Dr. Eduardo Migliaro y Dra. Silvia Olivera por aceptar la evaluación de la siguiente Tesis y brindar sus aportes.
- Al Lic. Federico Santiñaque y a la Ing. Agr. Beatriz López Carro, por el entrenamiento en el Servicio de Clasificación Celular y Citometría de flujo, sin los cuales hubiera sido imposible el desarrollo de la Tesis.
- A los Dres. Gerardo Javiel y Enrique Soto, por proporcionar los grupos de pacientes y los datos clínicos de cada uno para su posterior análisis y evaluación.
- A la Sección Referencia de la Biblioteca de Facultad de Ciencias quienes brindan su inapreciable apoyo a estudiantes, docentes e investigadores.
- Al Dr. Enrique Barrios y al Ing. Rafael Alonso por su acertado asesoramiento en la evaluación estadística de la siguiente Tesis.
- A mi querida amiga la Lic. Irene Da Cruz, por su apoyo y colaboración constante en muchos proyectos de mi vida.
- A la Dra. Rossana Bonomi, por sus inapreciables aportes en el campo de la Hematología, y dar siempre su certero consejo y enfoque crítico.
- A la Dra. Isabel Moro, por tantos detalles aportados dentro de la Hematología Clínica.
- Al Dr. Hugo Giordano, por su orientación técnica y por su incondicional apoyo en Citometría de Flujo.

- A la Lic. Daniela Infante y a la Auxiliar de Enfermería Claudia Caprio, quienes con destacable amabilidad y destreza técnica colaboraron en la obtención de las muestras.
- A mi padre y su señora Blanca, a mis hermanos Marcelo y Fabián, mis cuñadas Verónica y Fabiana y a la nueva generación Romanelli, Luca, Lucía y Chiara, quienes me han brindado apoyo y cariño.
- A mis amigos, Jair, Alejandra, Ricardito, Roxana, Sandra, Alejandrita, Isabel, Pablo, Rosa y Sergio quienes me han y seguirán acompañando a lo largo de la vida.
- A Uma quien me acompaña día a día en esta maravillosa travesía que es la vida.
- Y a las numerosas personas que brindaron su conocimiento para concluir esta Tesis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
I.- INTRODUCCIÓN	10
I.1. Moléculas de adhesión celular	10
I.1.1 Integrinas	11
I.1.2 Inmunoglobulinas	12
I.1.3 Selectinas	13
I.2. Plaquetas	17
I.2.1 Hematopoyesis	18
I.2.2 Trombosis	19
I.2.3 Gránulos plaquetarios	21
I.2.4 Activación plaquetaria	22
I.2.5 Marcadores de activación plaquetaria	24
I.2.6 Activación plaquetaria y diabetes mellitus	25
I.3. Cardiopatía isquémica	26
I.3.1 Causas de la cardiopatía isquémica	26
I.3.2 Dimorfismo sexual en la cardiopatía isquémica	27
I.4. Citometría de flujo	29
I.4.1 Principios generales de la técnica	30
I.4.2 Activación plaquetaria y citometría de flujo	32
I.4.3 Ventajas de la citometría de flujo en el análisis de plaqueta	34
I.4.4 Limitaciones de la citometría de flujo en el análisis de plaquetas	35
I.5. E.L.I.S.A.	36
I.5.1 Principios generales de la técnica	36
I.5.2 ELISA y activación plaquetaria	36
I.5.3 CD40L	37
II.- HIPÓTESIS	39
III.- OBJETIVOS	40
III.1 Objetivos generales	40

III.2 Objetivos específicos	40
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	41
IV.1 Definición del tipo de estudio epidemiológico	41
IV.2 Criterios de selección de grupos de estudio	41
IV.2.1 Diabetes Mellitus	41
IV.2.2 Cardiopatía isquémica	42
IV.2.3 Controles	42
IV.3 Obtención de las muestras	42
IV.4 Procesamiento de las muestras	43
IV.4.1 Citometría de flujo	43
IV.4.2 ELISA	44
IV.5 Medición de variables	45
IV.5.1 Activación plaquetaria	45
IV.5.1.a Inmunoquímica por citometría de flujo	45
IV.5.1.b Ensayos de E.L.I.S.A	48
IV.6 Análisis de los datos experimentales	48
IV.6.1 Correlación entre los datos experimentales y clínicos de los pacientes	48
IV.6.2 Inmunoquímica por citometría de flujo	49
IV.6.3 Ensayos de E.L.I.S.A	49
IV.6.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos	49
IV.7 Consideraciones éticas	50
V.- RESULTADOS	51
V.1 Niveles de mCD62p y CD61 mediante Citometría de flujo	51
V.2 Niveles de sCD62p y CD40L mediante ELISA	55
V.3 Análisis comparativo de los resultados obtenidos por ambas técnicas para los niveles de CD62p	62
VI.- DISCUSIÓN	63
VI.1 Selección de grupos	64
VI.2 Análisis estadístico	64
VI.2.1 Análisis de los cuatro grupos experimentales	64
VI.2.2 Análisis de los grupos con y sin cardiopatía isquémica	65
VI.2.3 Análisis estratificado por sexos	66

VI.2.4 Análisis de los resultados obtenidos para m y sCD62p	67
VI.3 Análisis de los datos experimentales y los datos clínicos de los pacientes	69
VI.4 Consideraciones finales	70
VII.- CONCLUSIONES	71
VIII.- PERSPECTIVAS	72
IX.- BIBLIOGRAFÍA	74
X.- ANEXOS	80

ABREVIATURAS

MAC	Moléculas de adhesión celular
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
AcMo	Anticuerpo monoclonal
CD62p	Selectina P
LFA	Antígeno de función del linfocito
ARNm	Ácido ribonucleíco mensajero
CFU-LM	Célula madre linfomieloide
PDGF	Factor plaquetario de crecimiento de fibroblastos
DM	Diabetes mellitus
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
Ag	Antígeno

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo civilizado. En nuestro país el 31% de las muertes totales en los últimos años, según las estadísticas del Ministerio de Salud Pública, son atribuidas a las enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, los procesos aterotrombóticos son causa de diferentes patologías, disminuyendo la calidad de vida y encareciendo el gasto en el Sistema de Salud. La elevada activación, así como el incremento de la reactividad plaquetaria son un mecanismo crucial en la trombogénesis arterial y pueden preceder al desarrollo de una alteración cardiovascular, aunque hasta la actualidad no se han desarrollado marcadores que permitan la correlación entre ambos eventos.

En este trabajo se ha evaluado si CD62p y/o sCD40L podrían ser marcadores de activación plaquetaria con valor diagnóstico para detectar tempranamente la propensión a la trombogénesis y eventualmente un riesgo cardíaco. Se determinaron los niveles de inmunoreactividad en 57 y 47 individuos con las técnicas de ELISA y Citometría de flujo respectivamente agrupados en cuatro grupos, a) pacientes diabéticos con isquemia, b) pacientes diabéticos sin isquemia, c) pacientes no diabéticos con isquemia y d) controles.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo muestran que la media del grupo con la doble condición (diabetes e isquemia) es el doble que la del grupo control aunque no se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Por el contrario, se detectaron diferencias estadísticamente significativas al contrastar las mujeres y los hombres con evento isquémico para ambos marcadores solubles con la técnica de ELISA. Tomando el conjunto de la muestra de la población estudiada el test de Levene para igualdad de varianzas y el test de Student para igualdad de medias con un I.C. del 95% mostraron un nivel de significación unilateral de $p= 0.004$ y $p= 0.045$ para sCD62p y sCD40L respectivamente. Más aun, con el mismo nivel de significación se observó $p= 0.023$ para sCD40L entre mujeres isquémicas y no isquémicas. Esto podría indicar que este último marcador es más sensible en mujeres que en hombres.

Utilizando la correlación de Pearson para el análisis de los datos obtenidos por ambas técnicas en la determinación de las dos isoformas de CD62p en la muestra de la población estudiada muestra la ausencia de correlación.

Si bien en nuestro país existen varios citómetros de flujo es la primera vez que se realiza un ensayo clínico sobre reactividad plaquetaria utilizando un citómetro de flujo. Tampoco existen antecedentes sobre la evaluación de CD62p en sus dos formas isoméricas en el mismo grupo de individuos.

Los resultados obtenidos en esta tesis pretenden ser un punto de partida de futuras investigaciones. Muestran que existen otros factores a considerar, además de los factores de riesgo tradicionales, y que cada marcador de activación plaquetaria debería evaluarse por separado de acuerdo al sexo.

El desarrollo de estrategias terapéuticas moduladoras de la hemostasia es un reto científico y un campo prometedor que se encuentra en la actualidad en su fase inicial de desarrollo.

I.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo civilizado (Serebruany et al, 2008). En nuestro país murieron 10.550 personas en el año 2007 y 9.582 en el 2008 por esta causa de acuerdo a los datos obtenidos en el Ministerio de Salud Pública, siendo la incidencia mayor en individuos mayores de 65 años (http://www.msp.gub.uy/uc_3791_1.html; consultada en el año 2010). Además, los procesos aterotrombóticos son causa de diferentes patologías, disminuyendo la calidad de vida y encareciendo el gasto en el Sistema de Salud.

La aumentada activación y reactividad plaquetaria son un mecanismo crucial en la trombogénesis arterial y preceden al desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Marquardt et al., 2002).

Si bien existen una gran diversidad de estudios sobre marcadores de activación plaquetaria (Jennings,1986; George, 1986; Ruf, 1997; Tschoepe, 1997; Tomer, 1999; van Kooten, 1999; Vitale, 2001; Marquardt, 2002; Ferroni, 2004; Yip,2004; Angiolillo, 2006; Yip, 2006; Osmancik, 2007; Serebruany, 2008; Tsai, 2009), ya sea con un fin diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico, en la actualidad no se ha verificado la existencia de un marcador totalmente fiable.

I.1 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR

La mayoría de las moléculas de adhesión celular (MAC) son glicoproteínas con secuencias de aminoácidos variables. Pueden ser agrupadas en un pequeño número de superfamilias, que difieren en la duración de las interacciones adhesivas que median, así como en la afinidad de las interacciones macromoleculares que soportan (Florensa et al., 2001).

Las MAC son esenciales en el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares. Facilitan la comunicación intercelular (célula-célula y célula-matriz) definiendo la arquitectura de los órganos. El microambiente medular es un órgano complejo en el que las células estromales son responsables de proporcionar la mayoría de los factores necesarios para el desarrollo ordenado de las células madre, estando sujetas a interacciones con citoquinas promotoras e inhibidoras del crecimiento, así como con componentes de la matriz extracelular y ligandos estromales que permiten la adhesión de las células (Florensa et al., 2001).

I.1.1 INTEGRINAS

La familia de las integrinas, formada por un conjunto de proteínas que intervienen en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, es de suma importancia en una variedad de procesos biológicos. Se denominan así, según su capacidad para integrar el citoesqueleto intracelular con la matriz extracelular. Estos receptores participan en diversos procesos celulares implicados en la adhesión, migración y asentamiento celular, la diferenciación celular, la inflamación y la diseminación metastásica. Estructuralmente, son glicoproteínas formadas por heterodímeros constituidos por una asociación no covalente entre una subunidad alfa de 120-180kD y una subunidad beta de 90-110kD que se combinan entre sí (Calvete, 1999; Florensa et al., 2001). En células en reposo usualmente no son adherentes pero los cambios en la actividad celular pueden desencadenar señales bidireccionales que modifican la conformación y aumentan la afinidad (Calvete, 1999).

El complejo Glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) es un receptor de adhesión del fibrinógeno, del factor de von Willenbrand, de la fibronectina y de la vitronectina; y

es la integrina más abundante en la superficie plasmática de las plaquetas. Es un marcador específico de las plaquetas y, siendo calcio dependiente, produce un cambio conformacional en el dominio extracelular que permite la exposición de los sitios de unión (Calvete, 1999). Asimismo, es mediador de la agregación plaquetaria formando unos puentes de unión entre las células (Mateo et al., 2006). Dentro de la familia de las integrinas se encuentran formando el complejo IIbIIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) la cadena alfa de la subunidad IIb, llamada CD41 y la cadena beta 3 de la subunidad IIIa denominada CD61. CD61 es una glicoproteína rica en cisteínas, que contiene un dominio N-terminal de 26 aa, un dominio extracelular de 856 aa, un dominio transmembrana de 26 aa y un dominio citoplásmico de 41 aa. La utilización de anticuerpos monoclonales (AcMo) que reconocen estos epítopes se utilizan como marcadores plaquetarios (Shattil et al., 1985; Jennings et al., 1986; Calvete, 1999; Osmancik et al., 2007; Serebruany et al., 2008).

Inicialmente la agregación se establece por este complejo pero el tamaño y la estabilidad del agregado plaquetario lo determina la Selectina-P (CD62p) (Merten y Thiagarajan, 2000).

I.1.2 INMUNOGLOBULINAS

La superfamilia de las inmunoglobulinas se expresan predominantemente en las células mediadoras de la inmunidad. A esta familia pertenecen los receptores de la célula T y las inmunoglobulinas. Los primeros reconocen péptidos antigénicos a través de dos moléculas de la superficie de las células presentadoras del antígeno, la molécula de histocompatibilidad mayor I y la II, así como a través de los receptores conocidos como antígenos de función del linfocito o LFA-2 y LFA-3.

Estos receptores se unen a unos contrarreceptores situados en la célula diana conocidos como ICAM-1 e ICAM-2 (Florensa et al., 2001).

I.1.3 SELECTINAS

La superfamilia de las selectinas -constituida, a su vez, por tres familias designadas por los prefijos L (leucocitos), E (endotelial) y P (plaquetas) intervienen en el asentamiento de los linfocitos y en las interacciones del leucocito, así como en la adhesión plaqueta-plaqueta y plaqueta con la célula endotelial (Florensa et al., 2001). Estas selectinas tienen estructuras similares pero se distribuyen de forma diferente en los tejidos (Blann y Lip, 1997). La principal diferencia estructural entre las selectinas es el número de dominios SCR (del inglés "short consensus repeat"). En humanos, la selectina P es la más larga, con 9 dominios SCR, mientras que la selectina E y la selectina L tienen 6 y 2 dominios respectivamente (Penella, 2008).

La selectina L (CD62L) es expresada esencialmente en todos los neutrófilos y monocitos, en la mayoría de las células T y B, y en las células *natural killer* (NK). Esta selectina se pierde rápidamente de la superficie celular de los leucocitos normales en respuesta a una variedad de estímulos. Por esta razón, se observa en el sobrenadante de leucocitos activados una forma más pequeña de la selectina L, que incrementa su concentración cuando desaparece la de membrana. Se le denominó selectina L soluble (sCD62L) (Kansas, 1996).

La expresión de la selectina E está limitada al endotelio y responde principalmente a estímulos inflamatorios (Kansas, 1996).

La selectina-P o CD62p se identificó a principios de los años ochenta del siglo pasado mediante el empleo de AcMo específicos para plaquetas activadas con trombina. Su papel como molécula de adhesión celular se describió a finales de

dicha década (Blann y Lip, 1997; Penella, 2008). Bajo determinadas condiciones CD62p es expresada por las plaquetas y las células endoteliales; presenta una masa aproximada de 140kD, es rica en cisteínas y se extiende aproximadamente 40 nm de la superficie endotelial. La isoforma asociada a la membrana (mCD62p) posee un dominio extracelular que contiene una región N-terminal con un dominio tipo lectina calcio dependiente, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, nueve RCR (del inglés “regulatory consensus repeats”), un segmento que atraviesa la membrana y una corta cola citoplasmática (Fig. 1) (Dunlop et al., 1992; Ushiyama et al., 1993; Chong et al., 1994; Kansas, 1996; Blann y Lip, 1997; Blann et al., 2003; Penella, 2008).

Es un componente de la membrana de los gránulos alfa de las plaquetas, y de la membrana de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales (Gurney et al., 2002); y se expresa en la membrana celular inmediatamente después de la activación (Osmancik et al., 2007).

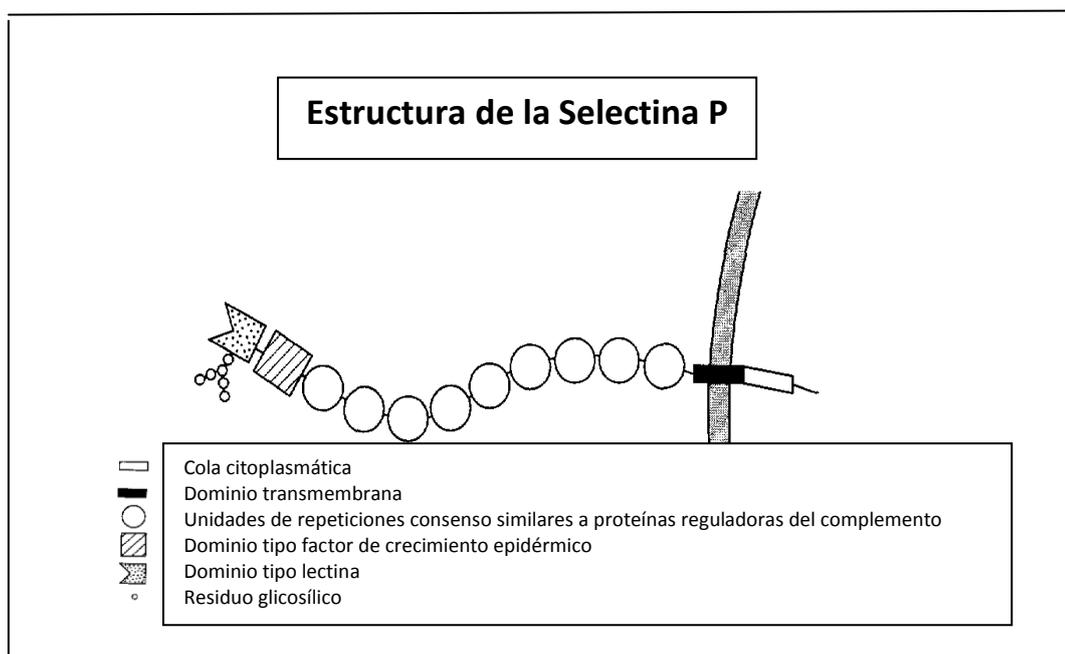


Fig. 1- Representación esquemática de la Selectina P (Blann, 1997).

Por otra parte, la expresión de CD62p en las plaquetas activadas no sólo se produce para la adhesión a neutrófilos, monocitos y endotelio, sino que también desempeña un importante rol en la agregación plaquetaria (Blann et al., 2003).

La expresión de CD62p es estable en plaquetas levemente activadas. En cambio, luego de la adición de un agonista fuerte la activación plaquetaria decrece en función al tiempo hasta aproximadamente el 40% transcurridos siete días (Schmidt y Hilberg, 2006).

Al igual que la selectina L existe una forma soluble de selectina P, denominada sCD62p (selectina P soluble) (Dunlop et al., 1992; Penella, 2008) que difiere en aproximadamente 3kD (Ushiyama et al., 1993; Chong et al., 1994) y carece del dominio transmembrana (Penella, 2008). La diferencia entre estas dos formas de CD62p es observada en sus ARN mensajeros (ARNm) que se diferencian en el "splicing" alternativo del exón 14 que codifica para el dominio transmembrana (Ushiyama et al., 1993; Chong et al., 1994). Los genes que codifican las selectinas en humanos se encuentran en clusters en el brazo largo del cromosoma número 1 (1q21-24) (Blann et al., 2003). Se han descrito polimorfismos que pueden afectar a la expresión o la funcionalidad de las selectinas que se han relacionado, en algunos casos, con procesos trombóticos (Barboux et al., 2001; Volcik et al., 2007; Penella, 2008).

La degranulación del cuerpo de Weibel-Palade aumenta los niveles del factor de von Willebrand pero no aumenta la expresión de la selectina-P; en cambio la degranulación de los gránulos alfa libera trombina que incrementa la expresión de la selectina-P (Blann y Lip, 1997, Blann et al., 2003).

sCD62p se encuentra en el plasma y proviene de las plaquetas activadas y del endotelio. Fijnheer y colaboradores (1997) y Blann y colaboradores (2003) sugieren

que, bajo condiciones normales, la concentración de sCD62p se obtiene mayoritariamente de las plaquetas activadas. Apoyando esta hipótesis, se observó utilizando inmunoensayos de lisado celular un menor nivel de selectina-P en el endotelio de las venas umbilicales humanas que en las plaquetas (Takeda et al., 1994). Estos datos sugieren que la sCD62p secretada por el endotelio no sería significativa (Blann y Lip, 1997). Además, la pérdida de mCD62p está asociada al máximo incremento de sCD62p (Michelson et al., 1996).

Por otro lado, al ser las plaquetas estructuras anucleadas, podrían contener una cantidad relativa de ARNm derivados de los megacariocitos para la expresión de sCD62p. Por lo tanto, existiría un nivel basal de sCD62p como resultado de la expresión de dichos mensajeros (Dunlop et al., 1992; Kansas, 1996).

A su vez, sCD62p inhibe selectivamente la adhesión de los neutrófilos al endotelio, por lo cual la administración terapéutica de selectina-P podría emplearse en el tratamiento de diversas patologías vasculares como agente antitrombótico (Gamble et al., 1990). Por otro lado, la utilización de inhibidores de selectina-P y de su ligando han demostrado poseer eficacia antitrombótica en modelos animales. Como contrapartida, se ha sugerido que el potencial procoagulante de esta selectina podría utilizarse para el tratamiento de enfermedades hemorrágicas como la hemofilia (Penella, 2008).

Dado que CD62p (soluble o de membrana) es un producto plaquetario, es de esperar la obtención de buenos resultados en terapias antitrombóticas y/o antihemorrágicas (Blann et al., 2003; Penella, 2008). La evidencia acumulada por tanto sugiere que CD62p puede ser utilizado como: a) marcador de la actividad plaquetaria a nivel de membrana; b) marcador plaquetario a nivel plasmático; c)

molécula predictiva de posibles patologías y; c) posible blanco terapéutico (Blann et al., 2003; Chong et al., 1994; Yip et al., 2006).

I.2 PLAQUETAS.

Las plaquetas fueron inicialmente identificadas en 1881 (Bizzozero, 1881) y recién en 1906 se determinó que correspondían a pequeños fragmentos de citoplasma que derivan de los megacariocitos (Wright, 1906). Se forman a partir de una célula progenitora común con el resto de las células mieloides. Habitualmente se distinguen distintos estadios evolutivos: el promegacarioblasto, el megacarioblasto, el promegacariocito, el megacariocito granular formador de plaquetas y el megacariocito desprendedor de plaquetas. En la serie megacariocítica, a diferencia de lo que sucede en el resto de las células hematopoyéticas, las divisiones celulares no van seguidas de las correspondientes divisiones citoplásmicas; fenómeno que conduce a la formación de células poliploides de gran tamaño con numerosos núcleos (Florensa et al., 2001).

Las plaquetas son pequeñas células sanguíneas discoides y anucleadas (Mateo et al., 2006). Cada megacariocito puede dar origen a unas 6 proplaquetas y éstas, a su vez, a unas 1.200 plaquetas (Florensa et al., 2001). Sus funciones principales son la rápida obturación de cualquier solución de continuidad producida en el endotelio vascular y la activación del sistema de coagulación-fibrinólisis. Además, se ha demostrado que intervienen en otro tipo de procesos como inflamación, cicatrización de las heridas, fibrosis, aterosclerosis, trombosis y diseminación de metástasis. En la membrana plaquetaria existen receptores tanto glicoproteicos como no glicoproteicos. Las glicoproteínas de membrana actúan como receptores mediando, entre otras, dos funciones críticas: la adhesión de las plaquetas a la

superficie vascular dañada y la interacción plaqueta-plaqueta o agregación plaquetaria. Los receptores no glicoproteicos actúan regulando la activación y agregación plaquetaria (Mateo et al., 2006).

Las plaquetas permanecen en la sangre periférica durante 8 o 12 días, después de los cuales son destruidas en el bazo por las células del sistema mononuclear fagocítico (Florensa et al., 2001).

Las plaquetas reticuladas son plaquetas jóvenes con abundante contenido de ARN. Esta población es el equivalente de los reticulocitos en la serie eritroide (Florensa et al., 2001).

I.2.1 HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es el mecanismo fisiológico responsable de la formación continuada de los distintos tipos de elementos formes sanguíneos, que los mantiene dentro de los límites de la normalidad de la sangre periférica (Florensa et al., 2001).

En los mamíferos, durante la etapa embrionaria y fetal, el sistema hematopoyético se desarrolla en diferentes localizaciones anatómicas. Alrededor de la tercera semana de gestación se desarrolla la hematopoyesis extraembrionaria. Las células madre hematopoyéticas se forman a partir de las células mesenquimales del saco vitelino. En este período la hematopoyesis se caracteriza por quedar restringida a la serie eritroide. A partir de la semana 11 de la gestación se instaura la hematopoyesis medular, que es el órgano hematopoyético definitivo (Florensa et al., 2001).

La médula ósea puede considerarse como un tejido blando contenido en un estuche óseo que cede células hematopoyéticas maduras a la circulación según

una pauta adecuada. La mayoría de estas células completan su maduración en el árbol vascular o en los tejidos (Florensa et al., 2001).

Se sabe que en el hombre existe una célula madre pluripotente con capacidad de proliferación, diferenciación y autorrenovación, denominada célula madre linfomieloide (CFU-LM). A partir de esta célula pluripotencial surgen la célula germinal linfoide y la germinal mieloide, generándose así los dos grandes linajes celulares. En el hombre adulto la hematopoyesis normal sólo se desarrolla en la médula ósea y está regulada por mecanismos de gran complejidad con interacción entre las células hematopoyéticas, con su microambiente, con los factores de crecimiento y la matriz extracelular (Florensa et al., 2001).

I.2.2 TROMBOSIS

Cuando en el organismo se produce un daño capaz de generar una hemorragia, el sistema de la hemostasia se encarga de la reparación de las lesiones. Inicialmente, será la formación del tapón o trombo plaquetario, como parte de la hemostasia primaria, lo que proporcionará de manera provisional un sustrato anatómico capaz de detener la hemorragia. Su formación dependerá en gran parte de las plaquetas, del endotelio vascular y de la interacción de las células sanguíneas con la pared vascular (Mateo et al., 2001).

Los trombos pueden formarse en cualquier localización del sistema cardiovascular, incluyendo las venas, las arterias, el corazón y la microcirculación. Las complicaciones de la trombosis están ocasionadas por los efectos de la obstrucción del vaso o por embolización a distancia del material trombótico y, con menor frecuencia, por consumo de factores hemostáticos (Mateo et al., 2001).

Normalmente los trombos venosos aparecen en las extremidades inferiores. Con frecuencia son silentes, pero pueden producir síntomas agudos si causan inflamación de la pared venosa, obstrucción al flujo o si embolizan en la circulación pulmonar. Tardíamente se producen lesiones en las válvulas venosas. El trombo venoso se forma en áreas de estasis y está compuesto por hematíes entremezclados con fibrina y relativamente pocas plaquetas (Mateo et al., 2001).

La trombosis arterial normalmente se asocia a patología vascular previa, fundamentalmente la aterosclerosis. El trombo arterial se forma en un ambiente de alto flujo y está formado principalmente por filamentos de fibrina y plaquetas (Mateo et al., 2001).

Los trombos intracardiacos se forman sobre válvulas lesionadas o inflamadas, en el endocardio adyacente a una zona de infarto de miocardio, en una cavidad cardíaca discinética o dilatada o en válvulas protésicas o dispositivos intravasculares (Mateo et al., 2001).

Los microtrombos pueden producir necrosis isquémica o hemorragias por consumo de plaquetas y factores de coagulación (Mateo et al., 2001). Además, los microtrombos podrían contribuir a la destrucción de las células beta del páncreas. Considerando que cada islote de Langerhans está irrigado por una simple arteriola, los disturbios en la microcirculación por la formación de agregados plaquetarios podría causar la destrucción de dichos islotes (Tschoepe et al., 1997).

Las plaquetas participan en interacciones que son fundamentales en la trombogénesis. Se adhieren a diferentes superficies (adhesión plaquetaria), cambian de forma y emiten pseudópodos, secretan el contenido de sus gránulos (reacción de liberación plaquetaria), se agregan en cúmulos (agregación

plaquetaria) y alteran su superficie de manera que facilitan las reacciones de coagulación (actividad procoagulante) (Mateo et al., 2001).

Durante los últimos treinta años se han definido y caracterizado muchos receptores plaquetarios para el análisis de los mecanismos moleculares de transducción de señales y así introducir nuevos tratamientos para la prevención primaria y secundaria de desordenes aterotrombóticos (Gazzaniga y Ottini, 2001).

I.2.3 GRANULOS PLAQUETARIOS

Los gránulos específicos de las plaquetas son los gránulos alfa, de identificación exclusiva ultraestructural, también denominados gránulos en “ojo de buey”, que contienen distintos tipos de proteínas e hidratos de carbono destacándose: a) factor plaquetario 4 (PF4); b) factor plaquetario de crecimiento de fibroblastos (PDGF); c) fibrinógeno, factor V y factor VIII/Von Willebrand, y d) otras proteínas como la trombospondina, la fibronectina, la albúmina, la alfa-1-antitripsina y la alfa-2-macroglobulina (Florensa et al., 2001; Mateo et al., 2001; Gurney et al., 2002; Mateo et al., 2006). Y como se mencionó anteriormente la selectina P se encuentra en la membrana de estos gránulos. Un segundo tipo de gránulos, minoritarios en relación a los primeros de identificación también submicroscópica, son los cuerpos o gránulos densos, que contienen adenínucleótidos, aminos biógenas, fosfato de calcio, serotonina, ADP, ATP (Florensa et al., 2001; Mateo et al., 2001; Gurney et al., 2002; Mateo et al., 2006,).

Como consecuencia de la interacción con los elementos del endotelio, la plaqueta sufre un proceso de activación que incluye una reestructuración de la membrana celular, de manera que la disposición de las glicoproteínas de membrana sea más funcional convirtiéndolas en un soporte eficaz para el asentamiento de los factores

de coagulación. Esto llevará a la formación de trombina, reforzando de este modo, la estimulación de las plaquetas. Todo este proceso, se acompaña de un cambio de forma, de discoidal a esférica, y de la secreción del contenido de los gránulos (Mateo et al., 2006).

I.2.4 ACTIVACION PLAQUETARIA

La lesión de la pared vascular origina la exposición y liberación de diversos agonistas que conducen a la activación plaquetaria. Dicha activación se basa en una sucesión de eventos complejos, que se inicia en la superficie celular mediante la interacción de un agonista con su receptor, generalmente una glicoproteína de membrana. Está bien establecido que consiste básicamente en la exposición de sitios de unión para moléculas de adhesión tales como el fibrinógeno y en la secreción del contenido de gránulos intracelulares los cuales aseguran la generación de agregados plaquetarios iniciando la formación del tapón hemostático (Shattil et al., 1985; Martínez et al., 2005).

Las oclusiones vasculares, dependiendo del lugar de ocurrencia, incluyen al infarto de miocardio, la angina inestable, el accidente vascular encefálico y las enfermedades vasculares periféricas, siendo las principales causas de muerte en el mundo desarrollado (Serebruany et al., 2008). Diversos estudios han demostrado un incremento de los marcadores de activación plaquetaria en: a) infarto isquémico agudo y crónico (van Kooten et al., 1999; Marquardt et al., 2002; Yip et al., 2004; Tsai et al., 2009); b) pacientes con distinta severidad de enfermedades de las arterias coronarias (Osmancik et al., 2007); c) síndrome metabólico (Serebruany et al., 2008); d) tromboastenia de Glanzmann (Jennings et al., 1986); e) síndrome de distrés respiratorio en adultos; f) cirugía cardíaca (George et al., 1986); g)

trombocitopenia inducida por heparina (Tomer et al., 1999); h) β -talasemia mayor (Vitale et al., 2001) i) fibrilación atrial (Ruf et al., 1997; Yip et al., 2006; Choudhury et al., 2008); j) enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren`s primario y la artritis reumatoidea (Sellam et al., 2009); k) esclerosis múltiple (Sheremata et al., 2008); l) diabetes mellitus (Tschoepe et al., 1997; Ferroni et al., 2004; Angiolillo et al., 2006; Yip et al., 2006; Neubauer et al., 2010) y en muchas otras más. Se ha observado una asociación positiva entre la activación plaquetaria y muchas de dichas patologías. Aun más, en el caso de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna se ha utilizado la detección de la CD62p por citometría de flujo como un marcador eficiente de la activación plaquetaria, por lo que se sugiere como un parámetro indicativo de un posible riesgo trombótico (Vega et al., 2006).

Los cambios en las glicoproteínas de la membrana plaquetaria pueden incrementar el riesgo de hemorragias o trombosis. En el torrente sanguíneo, un coágulo contiene concentraciones 30 a 40 veces más altas de glicoproteínas para el complejo GP IIB-IIIa. Así, un aumento en los niveles de CD62p podría indicar riesgo de trombosis. Más aún, se podrían detectar correlaciones entre determinadas patologías y sus concentraciones de glicoproteínas de membrana (George et al., 1986).

Existen pocos estudios enfocados a estudiar los valores o cambios seriales producidos en los marcadores de activación plaquetaria y en la interacción plaqueta-leucocito para predecir la posible aparición de un infarto. Por tanto, restan un importante número de interrogantes por responder sobre el fenómeno de la activación plaquetaria (Tsai et al., 2009). El conocimiento de cómo y dónde ocurre la trombosis es clave para el diagnóstico y tratamiento terapéutico (Xu et al., 2008).

I.2.5 MARCADORES DE ACTIVACION PLAQUETARIA

La activación plaquetaria puede determinarse midiendo la expresión de varias proteínas en la membrana que están involucradas en la adhesión y agregación y cuya expresión aumenta en plaquetas activadas (Osmancik et al., 2007). La expresión de CD62p en la membrana celular de las plaquetas está fuertemente asociado al tamaño medio del agregado plaquetario (Merten y Thiagarajan, 2000). Merten y colaboradores (2000), proponen que el evento inicial de la agregación plaquetaria es la unión del fibrinógeno para activar a la glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), uniendo así a las plaquetas adyacentes. Luego, las moléculas de selectina-P (progresivamente expresadas en la superficie de las plaquetas) se unen por intermedio de su dominio de lectinas al ligando correspondiente en las plaquetas adyacentes formando, de esta manera, un agregado plaquetario estable. La unión inicial de GPIIb/IIIa es necesaria para aproximar la selectina-P a su sitio de unión, siendo esta última la responsable de mantener la estabilidad del agregado plaquetario, evento de suma importancia en el proceso trombótico (Merten y Thiagarajan, 2000). Esta afirmación se apoya en que en la tromboastenia de Glanzmann (patología asociada a una anomalía en los genes que codifican para GPIIb/IIIa) no se produce la agregación plaquetaria a pesar de la presencia de selectina-P (Jennings et al., 1986). De hecho, la selectina-P es la única glicoproteína presente en la zona de contacto plaquetaria a los quince minutos del comienzo de la activación (Isenberg et al., 1986).

I.2.6 ACTIVACION PLAQUETARIA Y DIABETES MELLITUS

Comúnmente se asocia a la diabetes mellitus (DM) con complicaciones macro y microvasculares. Las macrovasculares se manifiestan en una aterosclerosis acelerada, resultante en enfermedades prematuras de las arterias coronarias, incremento en el riesgo de enfermedades cerebrovasculares y enfermedades vasculares periféricas severas. Los pacientes con DM del tipo dos tienen de 2 a 4 veces más de probabilidad de contraer alguna de estas afecciones (Plutzky et al., 2002; Hsueh, 2003; Ferroni et al., 2004).

El estado metabólico anormal que acompaña a la diabetes es el responsable de cambios que contribuyen a la aterosclerosis. Anomalías relevantes como la hiperglicemia crónica, la dislipidemia y la resistencia a la insulina hacen susceptible a las arterias a la aterosclerosis, así como la posibilidad de alterar las propiedades funcionales de muchas células incluidas las plaquetas y el endotelio. Hace tiempo que se conoce la agregabilidad plaquetaria en pacientes diabéticos y la disminución en la sensibilidad natural frente a agentes antiagregantes. Más aun, se ha identificado a la hiperglicemia crónica como un factor causal de activación plaquetaria "*in vivo*". La alteración a nivel de la membrana plaquetaria producida por la hiperglicemia resulta en el aumento en la expresión de receptores, como CD62p y GPIIb/IIIa (Ferroni et al., 2004).

La naturaleza multifactorial de estas patologías y el largo tiempo que frecuentemente precede a la aparición de ellas, muchas veces dificulta su estudio (Ferroni et al., 2004).

I.3 CARDIOPATIA ISQUEMICA

La isquemia cardíaca se define como la situación en la que el corazón recibe un aporte sanguíneo inadecuado para mantener sus funciones esenciales, con la consecuente carencia de oxígeno. Los tejidos biológicos necesitan obtener energía para sobrevivir a partir del metabolismo de moléculas que posee el propio órgano como reserva, o de moléculas que llegan a las células por la circulación sanguínea, donde el oxígeno juega un papel importante. En el caso del tejido de miocardio, la función es estrictamente dependiente de la irrigación sanguínea dada que, en su carácter de órgano altamente aerobio, el corazón posee una escasa reserva energética en caso de deficiente aporte sanguíneo (Kasper et al., Psaty et al., 2007).

1.3.1 CAUSAS DE LA CARDIOPATIA ISQUEMICA

Existen numerosas causas de isquemia miocárdica, pero indudablemente la más frecuente es la aterosclerosis coronaria. Esta patología representa un proceso prolongado, caracterizado por el estrechamiento progresivo de las arterias que irrigan el corazón como resultado del depósito en la pared arterial de lípidos y materiales asociados, con una disminución del lumen hasta llegar a un punto en el que el aporte sanguíneo es insuficiente. Otra causa de gran importancia es el vasoespasma coronario, una condición patológica en la que la pared arterial coronaria responde de forma hipersensible a los estímulos vasoconstrictores normales, ya sean emocionales, nerviosos u hormonales, teniendo como efecto una constricción anormal y prolongada de la pared arterial, con una consecuente isquemia tisular. Si este espasmo se relaja, puede no observarse signos de lesión,

pero si el espasmo es prolongado, puede traer como consecuencia un infarto de miocardio y la muerte del paciente.

Causas menos comunes de isquemia miocárdica incluyen la inflamación de las arterias coronarias con trombosis, la anemia severa y la hipotensión importante.

En cualquiera de las causas anteriores, los efectos que la oclusión arterial tiene sobre el miocardio son consecuencia de la interrupción del flujo sanguíneo, lo que provoca una compleja secuencia de mecanismos tanto metabólicos como estructurales (Kasper et al., 2004; Psaty et al., 2007).

1.3.2 DIMORFISMO SEXUAL EN LA CARDIOPATIA ISQUEMICA

Desde hace varios años se estudian las diferencias en la presentación de la cardiopatía isquémica según el sexo. Durante décadas se sostuvo que la mujer presenta el inicio de su cardiopatía isquémica en edades más tardías por el efecto preventivo de su conformación hormonal. Esta hipótesis respaldó al tratamiento de reemplazo hormonal durante la década de los noventa del siglo pasado, pero la evidencia científica la descartó. Las mujeres que recibieron tratamiento de reemplazo hormonal padecieron de enfermedad coronaria en el mismo porcentaje que las que no lo recibieron (Leslee et al., 2009).

También es cierto que las obstrucciones coronarias son más severas en el sexo masculino que en el femenino. En el hombre es más común la lesión multivaso y lesiones de tronco que en las mujeres. La miocardiopatía isquémica con repercusión severa de la fracción de eyección es más frecuente en el hombre que en la mujer. A su vez las mujeres tienen tendencia a presentar lesión de pequeño vaso, microvasculares. En ellas es más frecuente el infarto de miocardio con

coronarias normales, lo cual puede ser explicado por las particularidades de la disfunción endotelial (Leslee et al., 2009).

Existe evidencia que hay diferencias fisiopatológicas en la conformación de la enfermedad coronaria según el sexo. Las diferencias entre ambos sexos no implican que la enfermedad coronaria en la mujer sea más benigna; de hecho es en quienes se presenta una mayor mortalidad. También se observa que las mujeres tienen menos lesiones anatómicas y funcionales, pero una mortalidad similar o superior a los hombres. Cabe mencionar que la sintomatología es mayor en las mujeres, lo cual implica un incremento del número y períodos de internación. También son mayores los episodios de muerte súbita asociados a cardiopatía isquémica (Leslee et al., 2009).

Otros aspectos a tener en cuenta son:

- La hipertrigliceridemia es más importante en la mujer que en el hombre como factor de riesgo.
- Las mujeres diabéticas tienen tasas más elevadas de mortalidad por cardiopatía isquémica que los hombres en la misma condición.
- El sexo femenino presenta mayores tasas de reinfarto.
- Las mujeres tienen cifras más elevadas de proteína C reactiva que los hombres, lo cual puede expresar un sustrato inflamatorio más acentuado en las mujeres, que a su vez explica un predominio en las enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea, lupus eritematoso, entre otras. Además, la activación plaquetaria está también asociada a la disfunción endotelial, y esta última asociada a la disfunción microvascular y a la inflamación.

- Otros factores asociados a la cardiopatía isquémica en la mujer son la migraña, la enfermedad de Raynaud, ovario poliquístico y el vasoespasmo (especialmente en la región apical) (Leslee et al., 2009).

Dentro de las clasificaciones de riesgo de la enfermedad coronaria, generalmente se discrimina por sexo otorgándose mayor puntuación al sexo masculino, como ocurre con el Score de Framingham o de la Sociedad Europea (Euroscore), aunque se ha observado una subestimación en el pronóstico de la mujer. La clasificación de Reynolds es más específica para el análisis del score en función del sexo (Leslee et al., 2009).

I.4 CITOMETRÍA DE FLUJO

En la década de los 60 comenzó a desarrollarse la técnica de citometría de flujo, empleada en aquella época casi exclusivamente para el recuento y medida del tamaño de las partículas en laboratorios de investigación básica (Caunedo, 2004).

Es una técnica que permite el análisis individual de componentes en una población celular heterogénea u homogénea. Provee uno de los mejores métodos para el estudio de receptores proteicos ya que permite un análisis rápido y sencillo (Jennings et al., 1986). Su potencial analítico reside principalmente en la posibilidad de medir diversos parámetros en decenas de millares de células individuales en pocos segundos. El citómetro de flujo mide propiedades de absorción y dispersión de luz por la célula o partícula subcelular y fluorescencia emitida por fluorocromos unidos a componentes celulares de interés, inducidas por una iluminación apropiada (Monteiro et al., 2002).

I.4.1 PRINCIPIOS GENERALES DE LA TÉCNICA

Los componentes básicos de un citómetro de flujo incluyen:

1. *Fuente de luz*, que en general es un rayo LASER, por tratarse de una fuente de luz altamente direccionada, monocromática, coherente e intensa. La luz emitida, además, está concentrada en un haz estrecho. La mayoría de los citómetros actuales disponen de un LASER de ión argón.
2. *Cámara de flujo o boquilla* en las cuales se orienta el flujo de células y se consigue el paso de éstas en forma individual.
3. *Sistema óptico*, constituido por lentes que enfocan el haz de luz LASER para iluminar la muestra y espejos dicróicos y filtros que direccionan la emisión de fluorescencia de acuerdo a sus longitudes de onda a los detectores (fotomultiplicadores) correspondientes.
4. *Fotomultiplicadores y convertidores analógicos digitales*, que detectan y convierten las señales luminosas en impulsos eléctricos y éstos en señales digitales.
5. *Computador*, para adquisición, almacenamiento y análisis de los datos en tiempo real o en modo de matriz de datos (Monteiro et al., 2002).

Las células o partículas en suspensión a analizar son introducidas en una corriente líquida de flujo laminar (líquido de vaina) lográndose el denominado “enfoque hidrodinámico” el cual determina que las células o partículas desfilen en forma individual por la región central de la corriente líquida. El enfoque hidrodinámico asegura la correcta interacción con la luz LASER y, por tanto, una eficiente generación de señales luminosas. Las partículas transportadas por el flujo líquido interceptan el haz de luz LASER causando una dispersión de la luz incidente. La mayor o menor dispersión de luz según diferentes ángulos permite cuantificar el tamaño relativo y la complejidad (rugosidad de la superficie, granularidad interna)

de la célula. A pesar que la luz se dispersa en todas las direcciones, la cantidad de luz dispersa en ángulos pequeños hasta 10-20° (dispersión frontal o forward scatter), alrededor del eje del haz de láser, está relacionada con el tamaño relativo de la célula (cuanto mayor es la partícula, mayor la dispersión). Las plaquetas, por ejemplo, tienen valores de dispersión frontal (DF) inferiores a cualquier otra célula de la sangre, debido a su pequeño tamaño, lo que normalmente permite su distinción. Sin embargo, la correlación entre el tamaño de la célula y el valor de DF está afectada por diversos factores, concretamente por la simetría de la célula, la viabilidad y la presencia de componentes celulares que absorben la luz incidente. Este aspecto debe ser considerado cuando se usa la medición de DF para estimar tamaños relativos de células, en poblaciones de células heterogéneas. La luz LASER reflejada en todas direcciones debido a la estructura interna y de la superficie celular se denomina dispersión lateral (DL) o Side Scatter y se colectan a 90° (arquitectura ortogonal) en relación a la dirección de haz LASER. La distinción entre diferentes tipos de células de sangre humana es más fiable cuando se utiliza la combinación biparamétrica de DF y de DL, que con cada uno de los parámetros por separado (Monteiro et al., 2002).

La utilización de fluorocromos permite detectar y cuantificar un gran número de parámetros celulares. La fluorescencia emitida por estas moléculas, cuando son excitadas por el haz de luz LASER, genera información acerca de su presencia en células o partículas individuales. Al igual que la DL, la fluorescencia se emite en todas las direcciones pero es recolectada por el mismo sistema óptico en posición ortogonal con respecto al haz de iluminación LASER. Pueden ser direccionadas y cuantificadas emisiones de varios fluorocromos diferentes en la misma célula empleando espejos dicróicos (transmiten o reflejan determinadas longitudes de

onda) y filtros de banda (seleccionan regiones determinadas del espectro) (Monteiro et al., 2002). Los filtros de banda se interponen antes de los fotomultiplicadores (PMT) los cuales están destinados a la amplificación de las señales luminosas.

En la interpretación y en la validación de los datos, es de particular importancia la linealidad y la estabilidad del citómetro. La inestabilidad y/o irreproducibilidad pueden derivar de fluctuaciones en la potencia del láser, en el flujo de la muestra o debido a falta de alineación del citómetro. La no linealidad puede surgir de limitaciones en la linealidad de respuestas del fotomultiplicador o defectos en otros procesadores de señales electrónicos, y de la extinción ("quenching") dependiente de la concentración de los fluorocromos. La linealidad puede, con todo, ser evaluada usando CEN (Chicken Erythrocyte Nuclei), microesferas fluorescentes u otras partículas de referencia (Monteiro et al., 2002).

La capacidad multiparamétrica de la citometría de flujo permite analizar simultáneamente dos o más eventos, cuando se utilizan fluorocromos que emiten a diferentes longitudes de onda (Monteiro et al., 2002).

I.4.2 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y CITOMETRÍA DE FLUJO

La funcionalidad plaquetaria puede ser evaluada por metodologías variadas que detectan alteraciones morfológicas y bioquímicas así como la composición de la membrana asociadas a la activación celular. Entre los principales recursos utilizados para analizar la función plaquetaria se cuentan los métodos basados en: a) agregación plaquetaria; b) liberación de productos plaquetarios; c) análisis microscópico y; d) citometría de flujo (Monteiro et al., 2002).

Los primeros trabajos basados en esta última técnica surgieron a finales de la década de los 80 del siglo pasado. La introducción por Shattil y colaboradores (1987) de la citometría de flujo para el estudio de la función plaquetaria en sangre total fue un paso fundamental para su aplicación clínica. En la actualidad, los ensayos de citometría de flujo complementan, e incluso pueden reemplazar los estudios convencionales de función plaquetaria (Caunedo, 2004; Martínez et al., 2005).

La utilización de anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes ha permitido la detección y cuantificación de numerosos antígenos plaquetarios. En contraposición a la tinción de componentes celulares con diversos colorantes fluorescentes, la tinción con anticuerpos (inmunofenotipaje) proporciona un análisis de alta especificidad y sensibilidad. Para la mayoría de las glicoproteínas de la membrana plaquetaria se conoce su función y existen anticuerpos monoclonales disponibles. Algunos antígenos se expresan en la superficie tras la activación plaquetaria, pero no en la plaqueta en reposo (Monteiro et al., 2002).

El tamaño de las plaquetas está linealmente relacionado con la cantidad de fluorescencia emitida (Jennings et al., 1986). Para un preciso análisis en sangre total es importante que las plaquetas se diferencien claramente de los eritrocitos y leucocitos (Shattil et al., 1987).

Es importante impedir la activación plaquetaria previa al análisis citométrico. Para prevenir la activación *in vitro*, las muestras de sangre son estabilizadas durante la obtención y almacenamiento con antagonistas de la activación plaquetaria. En el caso que no sea posible realizar el análisis en un tiempo razonable, las muestras deben fijarse para su posterior estudio (Monteiro et al., 2002).

Las alteraciones en la activación y agregación pueden conducir tanto a situaciones protrombóticas como a estados hemorrágicos, por lo que se consideran importantes factores de riesgo de diversas enfermedades cardiovasculares. Por esa razón, el estudio de marcadores bioquímicos tempranos de activación puede ser relevante para evaluar el estado de activación de las plaquetas circulantes y la reactividad alterada, así como para proporcionar factores de riesgo predictivos en las disfunciones hemostáticas y sus terapias. Una vez establecido el diagnóstico celular, el pronóstico del proceso patológico puede evaluarse sobre la base de un ensayo citométrico predictivo, normalmente en coordinación con parámetros clínicos bien establecidos (Monteiro et al., 2002).

Existe un incremento en el uso de la citometría de flujo para la caracterización de fenotipos alterados en las plaquetas, que están relacionados con la activación celular, la homeostasis y la maduración de las células precursoras (Schmitz et al., 1998). La citometría de flujo es un método sensible y directo para detectar plaquetas activadas. Permite un análisis multiparamétrico de células individuales constituyendo por ello una técnica extremadamente útil en el estudio de las plaquetas. Es evidente que el análisis de las plaquetas por esta metodología es un área de investigación de gran interés y con innumerables aplicaciones clínicas (Shattil et al., 1987; Monteiro et al., 2002).

I.4.3 VENTAJAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ANÁLISIS DE PLAQUETAS

Una de las principales ventajas para la utilización de esta técnica es que se necesita poco volumen de sangre y menor tiempo de manipulación que otras (Jennings et al., 1986; Shattil et al., 1987).

Es posible trabajar con sangre entera sin la activación artefactual plaquetaria que frecuentemente se produce por la separación de hemocomponentes, como lavados y centrifugados (Jennings et al., 1986; Shattil et al., 1987).

Las dificultades resultantes de la posible activación *ex vivo* pueden ser evitadas por la fijación inmediata de las muestras de sangre, antes de proceder a su manipulación (Monteiro et al., 2002).

Asimismo, permite la identificación de subpoblaciones plaquetarias con gran sensibilidad, mientras que los otros métodos reflejan la activación media de la población plaquetaria (Monteiro et al., 2002; Martínez et al., 2005).

Pueden incorporarse en el mismo ensayo varios anticuerpos posibilitando la detección simultánea de diversos antígenos en subpoblaciones celulares bien identificadas (Martínez et al., 2005).

El análisis de plaquetas en sangre entera provee información más precisa de los fenómenos que suceden *in vivo* (Jennings et al., 1986).

No utiliza sustancias radiactivas (Martínez et al., 2005).

I.4.4 LIMITACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ANÁLISIS DE PLAQUETAS

A pesar de las ventajas que ofrece el uso de la citometría de flujo, la misma no está exenta de ciertas desventajas como puede ser:

Un elevado costo de equipos y anticuerpos (Martínez et al., 2005).

Disponer de personal altamente calificado (Martínez et al., 2005).

No permite con facilidad una cuantificación absoluta de los antígenos detectados.

Sin embargo, hay métodos actualmente disponibles para la cuantificación del número de anticuerpos unidos por célula (Monteiro et al., 2002).

La elección de los parámetros adecuados para analizar el fenómeno de interés y la valoración de los resultados, teniendo en cuenta las condiciones experimentales subyacentes, serán posiblemente las principales limitaciones de la citometría de flujo en el estudio de la función plaquetaria (Monteiro et al., 2002).

I.5 E.L.I.S.A.

I.5.1 PRINCIPIOS GENERALES DE LA TECNICA

La técnica de E.L.I.S.A. (del inglés *“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”*, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) nos permite detectar la concentración de un antígeno (Ag) o un anticuerpo (Ac) estando uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, y en el que la formación del complejo Ag-Ac se detecta mediante un trazador enzimático. La sensibilidad del ensayo depende, en gran parte, de la afinidad del Ac (Voller et al., 1978; Engvall, 2010).

Las etapas del inmunoensayo de ELISA se pueden dividir en: a) sensibilización de la placa, b) bloqueo de espacios vacíos, c) incubación con las muestras y con el estándar, d) incubación con el conjugado y, e) revelado (Voller et al., 1978; Engvall, 2010).

I.5.2 ELISA Y ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La activación plaquetaria libera proteínas específicas de los gránulos citosólicos y del propio citosol, entre ellas sCD62p y CD40L. Estas pueden ser medidas mediante la técnica de ELISA. Existen una gran cantidad de estudios que evalúan la activación plaquetaria con esta técnica (Dunlop et al., 1992; Ushiyama et al., 1993; Chong et al., 1994; Schönbeck et al., 2001; Furman et al., 2004; Choudhury et al., 2008; Neubauer et al., 2010)

1.5.3 CD40L

Pertenece a la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y también se le denomina CD154 o gp39. Es una proteína integral de membrana de 32 a 39 kD que se expresa predominantemente en linfocitos T CD4 activados, pero también se ha descrito en células T CD8, eosinófilos, mastocitos, basófilos, células *Natural Killer*, células dendríticas, células de la musculatura vascular lisa y plaquetas activadas (Fig. 2).

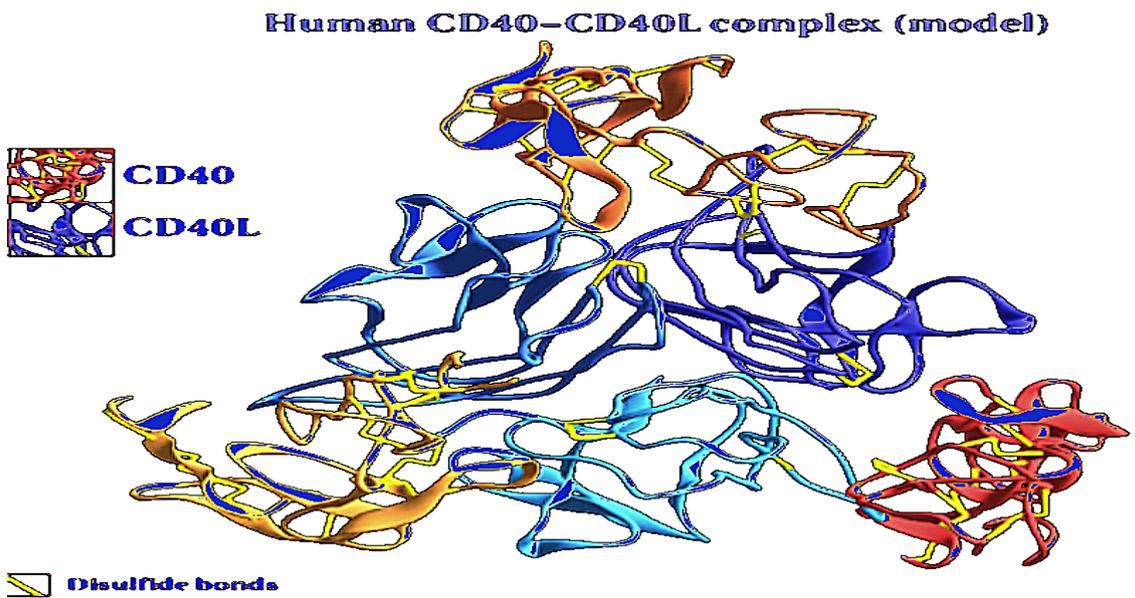


Fig. 2- Complejo CD40L-CD40 (Peitsch et al., 1995)

Desde el punto de vista estructural, CD40L forma un trímero y CD40 se une a dicho trímero en la interfase entre dos monómeros. La expresión de estas moléculas en diversos tejidos confirma que las interacciones CD40/CD40L son claves en la regulación de numerosos procesos de activación del sistema inmune constituyendo un ligando proinflamatorio y protrombótico (Schönbeck et al., 2001; André et al., 2002; Furman et al., 2004; Guerrero et al., 2005; Chandler et al., 2009).

La interacción CD40-CD40L tiene un rol central en la patogénesis de la aterosclerosis. La plaqueta en reposo no expresa CD40L en su membrana plasmática. *In vitro* una vez activada la plaqueta se produce una considerable

expresión de CD40L en la membrana celular; y también frente a la presencia de un trombo *in vivo* (Furman et al., 2004).

Luego de su activación las plaquetas secretan gran cantidad de CD40L (sCD40L) en un periodo de minutos a horas. Por esta razón las plaquetas activadas son la causa predominante de la existencia de altos valores de sCD40L en sangre. La secreción de esta molécula está en parte regulada por el complejo GP IIb/IIIa y la polimerización de la actina, ambos procesos relacionados con la activación plaquetaria (Furman et al., 2004).

Mientras CD62p se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas, CD40L está libre en el citosol plaquetario (Neubauer et al., 2010).

Estos datos sugieren a sCD40L como un posible buen marcador de activación plaquetaria.

II.- HIPÓTESIS

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo desarrollado. En Uruguay fueron 10.550 las personas muertas por estas afecciones en el año 2007, y 9.582 en el año 2008 de acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Salud Pública (http://www.msp.gub.uy/uc_3791_1.html; consultada en el año 2010). Sin embargo, no hay un diagnóstico molecular que permita la detección *a priori* de un potencial evento cardiovascular. Dada la importancia de identificar cualitativa y cuantitativamente un marcador molecular temprano de activación plaquetaria como predictor de un posible evento cardiovascular la hipótesis planteada en la siguiente Tesis es:

La selectina-P es un marcador precoz de activación plaquetaria que permite detectar la formación de trombosis y de subsecuentes eventos cardiovasculares. Su determinación mediante citometría de flujo o ELISA son metodologías diagnósticas de riesgo cardiovascular.

III.- OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la selectina-P como un marcador de activación plaquetaria con valor predictivo de riesgo cardiovascular.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimización del procesamiento y almacenamiento de muestras humanas para ser analizadas posteriormente por ELISA.
2. Determinación de concentraciones, tiempos de reacción, diluciones y tiempo de procesamiento de las muestras para cada técnica.
3. Analizar la activación plaquetaria por la técnica de citometría de flujo utilizando los AcMo anti CD62p y anti CD61 en cuatro grupos experimentales: a) controles, b) diabéticos sin evento isquémico c) diabéticos con evento isquémico e d) isquémicos no diabéticos.
4. Analizar la activación plaquetaria a través de AcMo antiCD62p y antiCD40L, por la técnica de ELISA en los mismos grupos experimentales citados en el objetivo.
5. Realizar la evaluación plaquetaria individual en cada paciente para establecer si existe ó no correlación entre la activación plaquetaria y la clínica.
6. Realizar análisis de datos incluyendo estadística descriptiva e inferencial.
7. Analizar y correlacionar los niveles de mCD62p (citometría de flujo) y sCD62p (ELISA).
8. Complementación de ambos abordajes para el mejor empleo y tratamiento de las muestras y los datos obtenidos.

IV.-MATERIALES Y METODOS

El proceso de activación plaquetaria es sumamente complejo, y presenta una serie de acontecimientos que comienzan con un flujo de calcio y terminan en la agregación célula-célula (Shattil et al., 1985; Martínez et al., 2005) lo que conlleva a un ajuste muy específico de cada técnica a utilizar, como se detallará en el correr de este capítulo. Se intentó de establecer si existe una relación o asociación entre la activación plaquetaria y la ocurrencia de eventos cardiovasculares, realizándose la evaluación de marcadores de activación plaquetaria. Dado el tamaño y heterogeneidad de la población analizada no se espera detectar relación de causalidad entre las variables en estudio.

IV.1 DEFINICION DEL TIPO DE ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

Se realizó un estudio transversal, caso-control y se trabajó bajo un régimen de doble ciego.

Se analizaron 47 y 57 individuos con las técnicas de citometría de flujo y E.L.I.S.A. respectivamente entre 39 y 78 años (Tabla A.I y A.II).

IV.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

IV.2.1 DIABETES MELLITUS

Para la definición de presencia o ausencia de diabetes se siguieron los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (Report of Committee Expert American Diabetes Association). Se utilizaron los siguientes criterios de exclusión: a) quienes no tuviesen realizados estudios para cardiopatía isquémica; b) individuos portadores de insuficiencia renal. Todos los individuos de este grupo padecen diabetes mellitus del tipo 2.

IV.2.2 CARDIOPATIA ISQUEMICA

Se consideró la presencia de cardiopatía isquémica demostrada y documentada según los criterios diagnósticos del Report of the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines Committee o cineangiocoronariografía, o ambas (para el cateterismo se consideraron lesiones críticas aquellas que tenían una disminución significativa del flujo: reducción del diámetro en 50% o de su sección en al menos 70%). Se consideró ausencia de eventos cardiovasculares con 2 ergometrías negativas.

IV.2.3 CONTROLES

Los pacientes controles fueron seleccionados con los siguientes criterios de exclusión: no ser diabéticos, no haber requerido transfusión sanguínea, no consumir medicamentos ni drogas que interactúen con la activación plaquetaria, no portar o haber tenido tumores o cáncer o presentar dislipidemias o hipertensión no controladas. Además se requirieron estudios de funcionalidad hepática, recuento de WBC y controles de temperatura corporal.

Todos los pacientes fueron seguidos por un cardiólogo y un diabetólogo.

IV.3 OBTENCION DE LAS MUESTRAS

La extracción de las muestras se realizó con mariposas BD Vacutainer de 21G x 3/4" x 7" y en el horario de 14 a 17hs para evitar variaciones circadianas. La sangre se recolectó en tubos Vacutainer de 4,5 mL citratados al 0.129 M (3.8%). Se descartaron los primeros 2 mL de la extracción para evitar la activación artefactual.

Se realizó una selección de protocolos descritos en la literatura para el procesamiento de las muestras y se consultó a personal especializado en crisis y bancos de sangre para la conservación de las mismas (Dunlop et al., 1992; Bermejo et al., 2004, Furman et al., 2004; Vega et al., 2006; Ferroni et al., 2008; Sheremata et al., 2008).

IV.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se optimizaron las condiciones de su procesamiento y almacenamiento, las cuales se analizaron mediante los dos abordajes: citometría de flujo y ELISA. Para el mejor empleo y tratamiento de las muestras, se coordinaron ambos abordajes para decidir los protocolos a utilizar que permitieran la complementación de datos.

IV.4.1 CITOMETRIA DE FLUJO

El procesamiento de las muestras para la medición por citometría de flujo se realizó en sangre entera inmediatamente después a la extracción de acuerdo al protocolo detallado en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Protocolo de procesamiento de las muestras de sangre entera para citometría de flujo.

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Preparar solución salina tamponada (PBS) citratado2. Vortexear los anticuerpos3. Girar tres veces el Vacutainer conteniendo sangre4. Agregar en un tubo 100 μL de PBS citratado5. Agregar al mismo tubo 5 μL de sangre6. Agregar al mismo tubo 5 μL de anticuerpos anti CD62p y 5 μL de anticuerpos anti CD61 a oscuras |
|---|

7. Resuspender con los dedos tres veces
8. Incubar 45 min a oscuras y a temperatura ambiente.
9. Fijar agregando al mismo tubo 250 μ L de paraformaldehído (PFA) al 4%,
llegando a una concentración final de PFA al 2.74%
10. Resuspender tres veces con los dedos
11. Esperar 10 min
12. Agregar al mismo tubo 635 μ L de PBS citratado, llegando a una
concentración final de PFA al 1%

Volumen final	= 1000 μ L
Concentración de sangre	= 1:200
Concentración Final PFA	= 1%
PBS Citratado	= 0.0129 M (3.8%)
Tiempo de incubación	= 45 min
Temperatura de incubación	= Temperatura ambiente

IV.4.2 E.L.I.S.A.

La forma de preservación de las muestras de los mismos pacientes para su posterior análisis por ELISA se puede visualizar en el protocolo del cuadro 2.

Cuadro 2.- Protocolo de procesamiento de las muestras para ELISA.

- 1) Centrifugación a temperatura ambiente de sangre entera a 3000 rpm (20 min) para obtener un plasma pobre en plaquetas (PPP).
- 2) Conservar el PPP a -20°C.

- 3) El día de las determinaciones, descongelar el PPP a 37°C durante 10 min. en baño de agua y centrifugar (3000 rpm, 20 min). Dilución de los estándares de acuerdo al protocolo del fabricante.
- 4) Dilución de las muestras de PPP de 1:10 a 1:200 para CD40L y de 1:30 a 1:500 de CD62p.

IV.5 MEDICION DE VARIABLES

IV.5.1 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La exposición de moléculas de adhesión en la membrana celular, el cambio de morfología plaquetario, la secreción de agonistas y la formación de pseudópodos son cambios importantes en la agregación plaquetaria.

IV.5.1.a INMUNOCITOQUIMICA POR CITOMETRIA DE FLUJO

Se evaluó la activación plaquetaria por la exposición de la Selectina-P (mCD62p) en la membrana celular por citometría de flujo. Además, se utilizó la marcación del complejo IIb-IIIa (CD61) como marcador de plaquetas.

La medición se llevó a cabo con los AcMo de ratón antiCD62p conjugados con Ficoeritrina y antiCD61 conjugados con PerCP (ab42795 y ab91130, ABCAM, Cambridge, Massachusetts). Se emplearon para todas las determinaciones un citómetro de flujo y clasificador celular FACSVantage (Becton Dickinson, Estados Unidos) equipado con un láser de argón que emite a 488 nm a una potencia de 100 mW. El citómetro posibilita la detección de DF, DL y tres canales de fluorescencia (530/30; 575/26 y 675/20). Se calibró con "Chicken Red Blood Cells" (CRBC) y posteriormente para optimizar la detección de partículas pequeñas se realizó un

ajuste más delicado con microesferas de 1 μm , ya que las plaquetas tienen un tamaño promedio de 1 a 4 μm .

Todos los datos fueron cuidadosamente chequeados y reanalizados. En algunas pocas muestras se observaron algunas microesferas en la medición por su tendencia a pegarse a los tubos del citómetro. Estas esferas se identifican claramente en gráficos de puntos de fluorescencia por lo que su exclusión no afecta a las plaquetas. De incluirlas podrían dar falsos positivos de activación.

Cada medición consistió en la adquisición de 10.000 plaquetas. Se realizó la medición de cada paciente por triplicado, obteniéndose un valor promedio de cada muestra analizada.

Con cada adquisición se realizó una adecuada colocación de las regiones (gates) que contiene a las plaquetas activadas sobre las poblaciones identificadas.

Posteriormente, se efectuó una compensación con microesferas Calibryte (Becton Dickinson, San José, California), que permite sustraer digitalmente las señales fluorescentes inespecíficas debido al solapamiento de los espectros de emisión.

Luego de realizados todos los ajustes necesarios, se procedió a la identificación plaquetaria en las muestras de los individuos a analizar. Las plaquetas se identificaron en un gráfico dispersión frontal vs. dispersión lateral (DF/DL) delimitando lo más posible la región para evitar la inclusión de restos celulares y ruido electrónico. La marcación para los distintos anticuerpos se detectó en gráficos de puntos de FL1 (PE) y FL2 (PerCP), subordinados a la región que identifica las plaquetas. Las determinaciones se llevaron a cabo en el Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF) del IIBCE.

Dado que en la toma de los límites superiores de las mediciones se observaba determinada variabilidad, se decidió tomar dos regiones distintas para evaluar la

activación plaquetaria. La región denominada R2 contiene solamente plaquetas activadas, las cuales fueron determinadas por su tamaño, complejidad y fluorescencia. En cambio, la región R3 además de contener a R2 contiene eventos bastante más grandes que las plaquetas cuyo origen se desconoce. Se supone que podrían ser agregados plaquetarios y agregados de plaquetas con otros grupos celulares (Fig. 3).

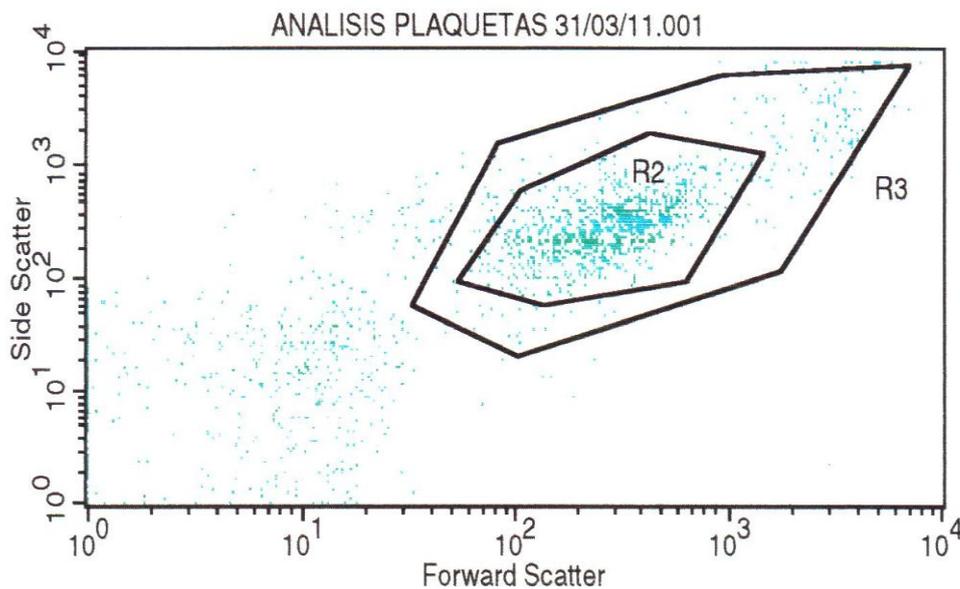


Figura 3- Gráfico de puntos de dispersión frontal (Forward Scatter) y dispersión lateral (Side Scatter) donde R2 representa la región que contiene a las plaquetas activadas y R3 la región que contiene plaquetas activadas junto a agregados plaquetarios.

Adicionalmente se incluyen datos del “Histogram Statistics software”, como la media del histograma de CD62p construido a partir de la región R2 (Gráfico 5). Este valor no representa un porcentaje, y es un indicador relativo con respecto a la escala logarítmica de amplificación de la fluorescencia. En los casos que se visualiza una marcada activación plaquetaria, la media también aumenta lo cual descarta que el dato Quad UR dependa del límite marcado como positivo y negativo.

IV.5.1.b ENSAYOS DE E.L.I.S.A.

La evaluación de la activación por ELISA se realizó con los AcMo anti CD62p y anti CD40L, ambos marcadores de activación plaquetaria, y se utilizaron los siguientes kits comerciales de RayBiotech Inc (Norcross, Georgia, EEUU):

- RayBio Human P-Selectin ELISA kit para la cuantificación de los niveles de CD62p.
- RayBio Human CD40 Ligand ELISA kit para la cuantificación de los niveles de CD40L.

La medición de densidad óptica se llevó a cabo en un espectrómetro Thermo Scientific Varioskan Flash con Thermo Scientific SkanIt Software for Varioskan Flash versión 2.4.3 a 450nm siguiendo las indicaciones de los fabricantes. El procesamiento de las muestras, la utilización de los kits, y su posterior lectura se realizaron en el Laboratorio del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del IIBCE.

Cada muestra se analizó por triplicado obteniendo un promedio de las tres mediciones.

IV.6 ANALISIS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

IV.6.1 CORRELACION ENTRE LOS DATOS EXPERIMENTALES Y CLINICOS DE LOS PACIENTES

El evento cardiovascular enfocado en este estudio es la isquemia. Se realizó una correlación entre la clínica de cada paciente y los datos obtenidos sobre activación plaquetaria en ambas técnicas. Los pacientes diabéticos y con eventos isquémicos fueron seleccionados por el equipo médico de acuerdo a su historia clínica y en los centros de atención de salud en los que trabajan (uno público y otro privado). Se investigó así, una posible asociación entre ambas variables.

IV.6.2 INMUNOCITOQUIMICA POR CITOMETRIA DE FLUJO

Para el citómetro de flujo se analizaron 11 muestras de pacientes diabéticos con cardiopatía isquémica, 10 de pacientes diabéticos sin cardiopatía isquémica, 11 de pacientes isquémicos no diabéticos y 15 controles.

IV.6.3 ENSAYOS DE E.L.I.S.A.

Para la técnica de ELISA se analizaron 17 muestras de pacientes diabéticos con cardiopatía isquémica, 11 pacientes diabéticos sin cardiopatía isquémica, 12 pacientes isquémicos no diabéticos y 17 controles.

IV.6.4 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Se realizó un análisis estadístico descriptivo e inferencial.

Se utilizó el test de Student de comparación de medias, el test de Levene para igualdad de varianza y el coeficiente de correlación de Pearson.

Los distintos paquetes de programas estadísticos utilizados para el análisis son:

Origin 8.0 (<http://origin.softonic.com/>)

SigmaStat 2.0 (<http://sigmaplot.com/>)

SSPS 10,0 (Standar versión SSPS Inc.)

EPIINFO 6,0 (<http://www.cica.es/aliens/epiinfo/>)

Epidat 3.1 (<http://sergas.es/EPIWB/>)

IV.7 CONSIDERACIONES ETICAS

El proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética del MSP y los correspondientes a cada institución participante y se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente.

Se suspendió toda medicación que pudiera interferir con la agregación plaquetaria (warfarina, clopidogrel y aspirina) durante los 7 días previos a la extracción. Las dosis terapéuticas de los pacientes eran similares, y cada paciente estuvo bajo el seguimiento del médico tratante.

V.- RESULTADOS

V.1 NIVELES DE mCD62p Y CD61 POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En base a lo descrito en materiales y métodos se utilizó CD62p como marcador de activación plaquetaria y CD61 como marcador plaquetario; y cada medición consistió en la adquisición de 10.000 plaquetas. Cada muestra se analizó por triplicado obteniendo así un promedio.

Los datos "Quad UR", para realizar los gráficos del 1 al 6 provienen del cuadrante estadístico superior derecho, es decir el sector doble positivo para los gráficos de puntos CD61 y CD62p. Por lo tanto, el valor indicado es un porcentaje de activación con respecto a la región seleccionada en cada caso. Dado que en la toma de los límites superiores de las mediciones se observaba determinada variabilidad, se tomaron dos regiones distintas para evaluar la activación plaquetaria. La región denominada R2 contiene solamente plaquetas activadas, las cuales fueron determinadas por su tamaño, complejidad y fluorescencia. En cambio, la región R3 además de contener a R2 contiene eventos bastante más grandes que las plaquetas cuyo origen se desconoce. Se supone que podrían ser agregados plaquetarios y agregados de plaquetas con otros grupos celulares.

En los gráficos 1 y 2 se visualiza un claro aumento en la marcación con mCD62p para los pacientes con la doble condición (diabetes y cardiopatía isquémica); sin embargo no se evidenciaron diferencias significativamente estadísticas.

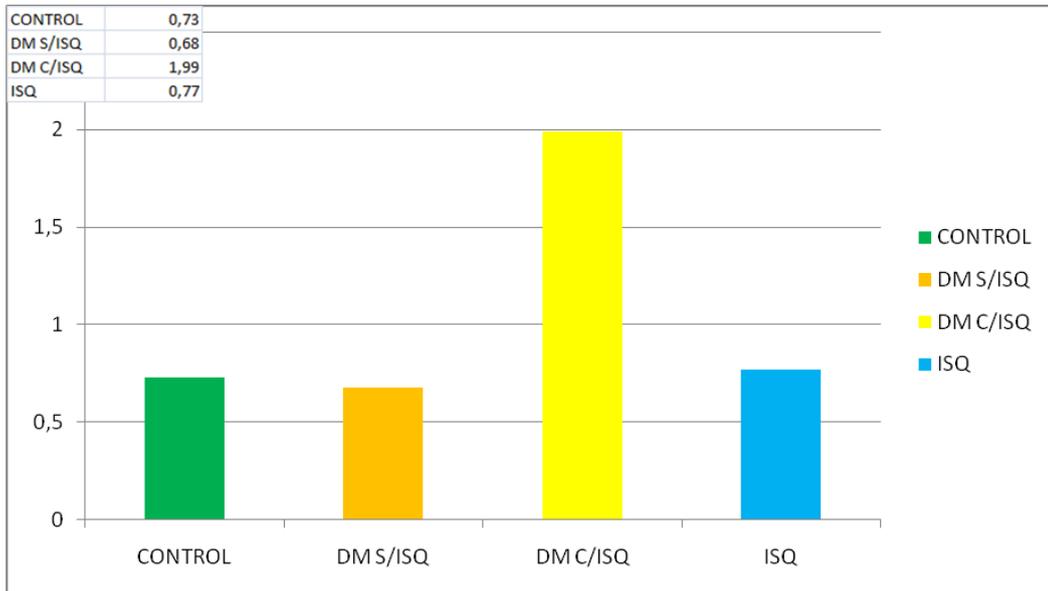


Gráfico 1.- Promedios de los porcentajes de activación plaquetaria para cada grupo medidas con CD62p y CD61 para la región Q-UR R2.

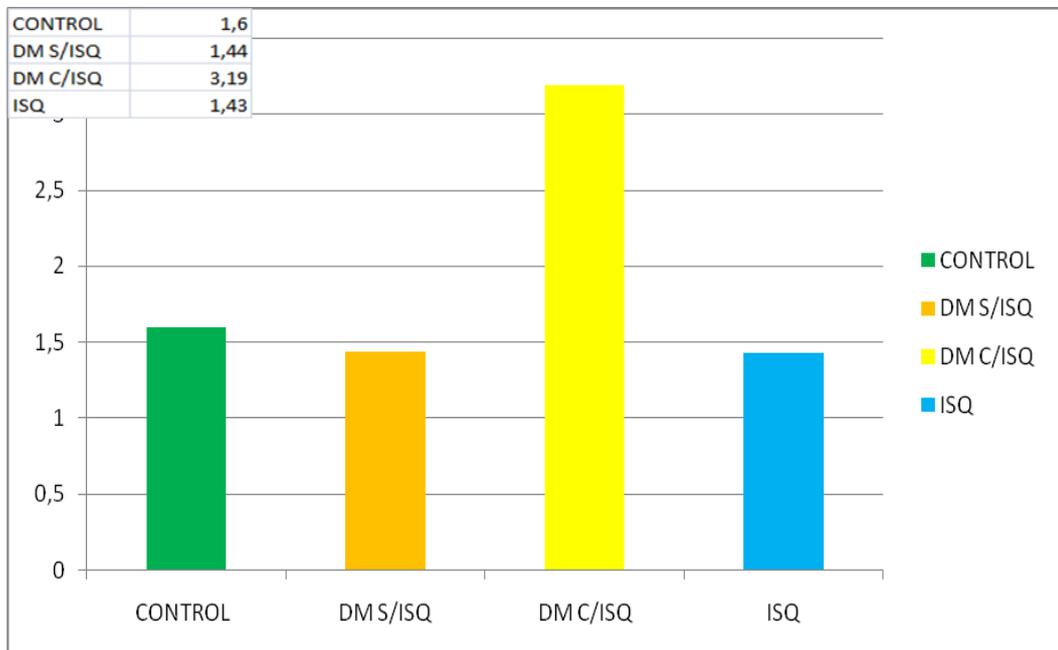


Gráfico 2.- Promedios de los porcentajes de activación plaquetaria para cada grupo medidas con CD62p y CD61 para la región Q-UR R3.

En los gráficos 3 y 4 se observa una clara diferencia entre el grupo que ha padecido un evento isquémico y el grupo libre de isquemia. En este caso, el marcador mCD62p evidenció que la media obtenida para el grupo que ha sufrido

una cardiopatía isquémica es casi el doble que el otro grupo tanto para la región Q-UR R2 (Gráfico 3) como para la región Q-UR R3 (Gráfico 4). Sin embargo, las diferencias obtenidas no muestran significancia estadística.

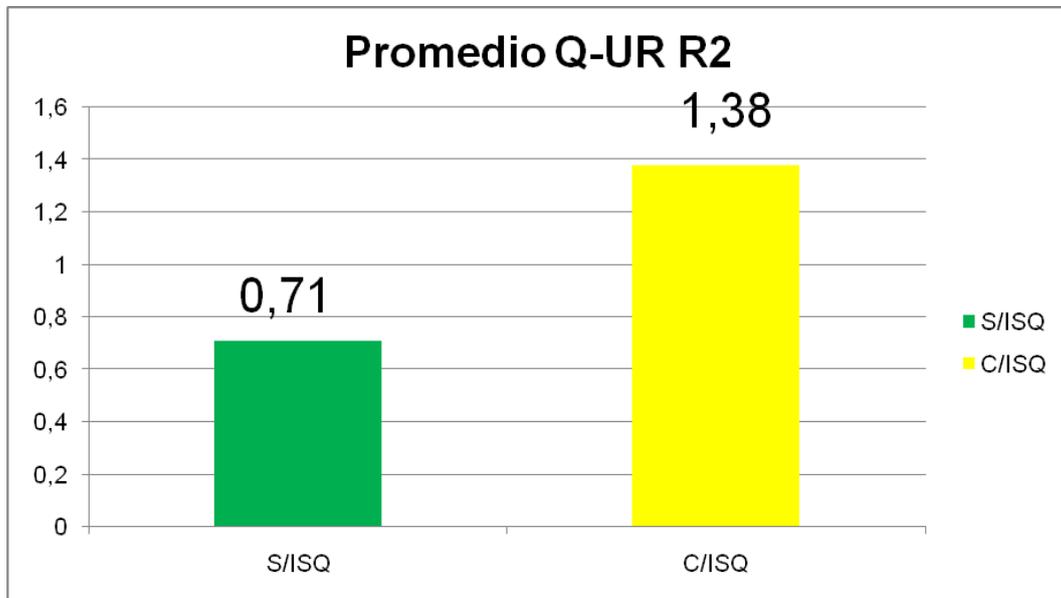


Gráfico 3.- Promedio de los porcentajes de activación plaquetaria para el grupo de pacientes que sufrió un evento isquémico y para el grupo que no fue afectado por ningún evento isquémico medidos con CD62p y CD61 para la región Q-UR R2.

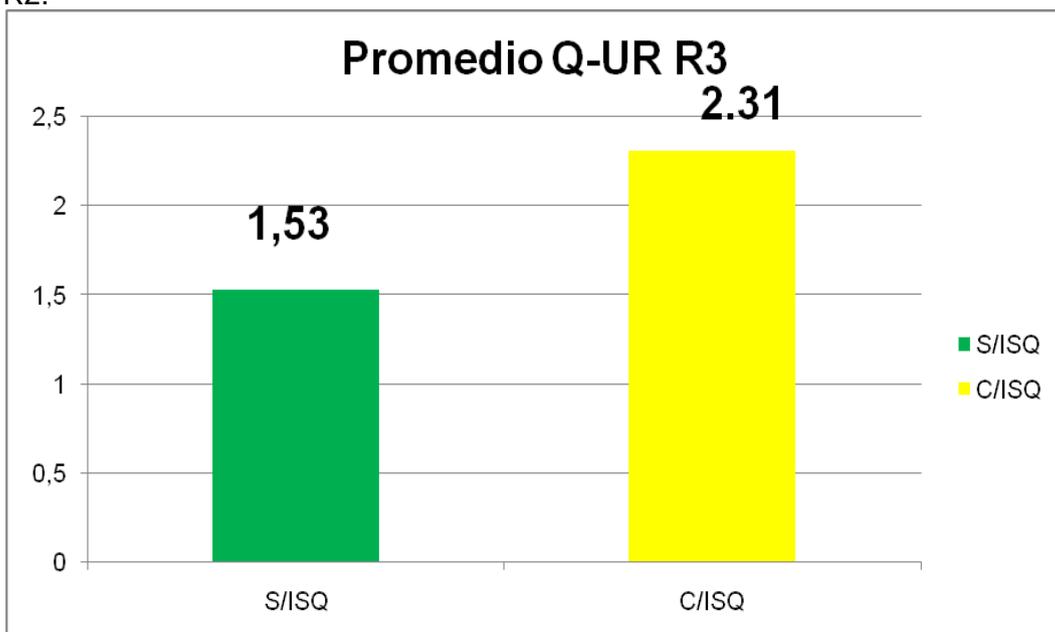


Gráfico 4.- Promedio de los porcentajes de activación plaquetaria para el grupo de pacientes que sufrió un evento isquémico y para el grupo que no fue afectado por ningún evento isquémico medidos con CD62p y CD61 para la región Q-UR R3.

En el gráfico 5 se observan las medias obtenidas del “Histogram Statistics software” construido a partir de la región R2. Este valor no representa un porcentaje, y es un indicador relativo con respecto a la escala logarítmica de amplificación de la fluorescencia. En los casos que se visualiza una marcada activación plaquetaria, la media también aumenta lo cual descarta que el dato Quad UR dependa del límite marcado como positivo y negativo.

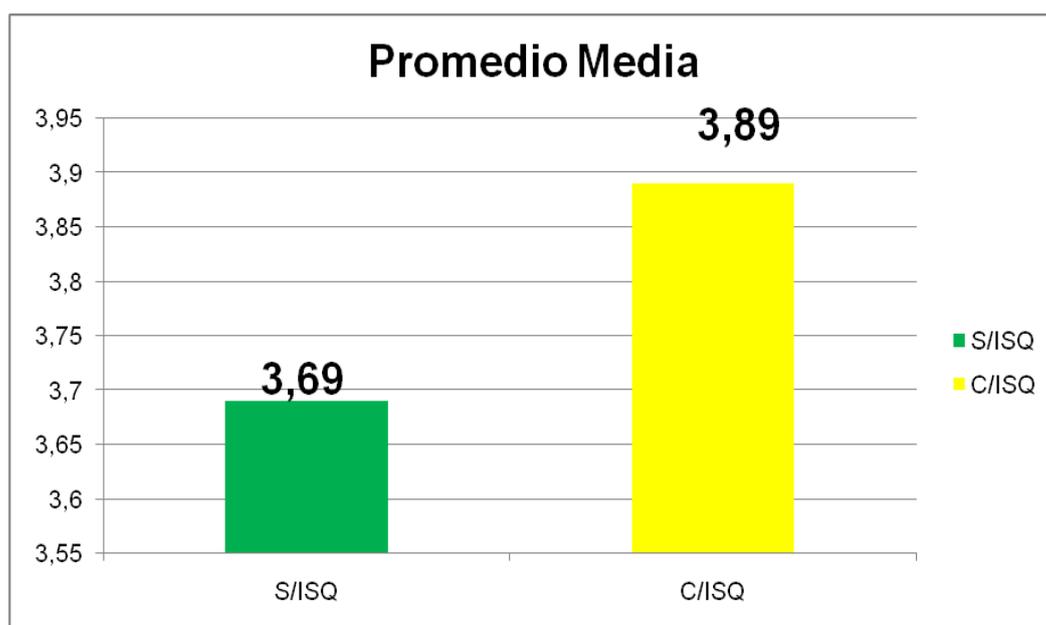


Gráfico 5.- Promedio de la media del histograma de CD62p como marcador de activación plaquetaria para el grupo de pacientes que sufrió un evento isquémico y para el grupo que no fue afectado por ningún evento isquémico construido a partir de la región Q-UR R2.

El gráfico 6 muestra la gran heterogeneidad evidenciada en el grupo con la doble condición, por la elevada dispersión en los valores observada, en contraste con el grupo de controles.

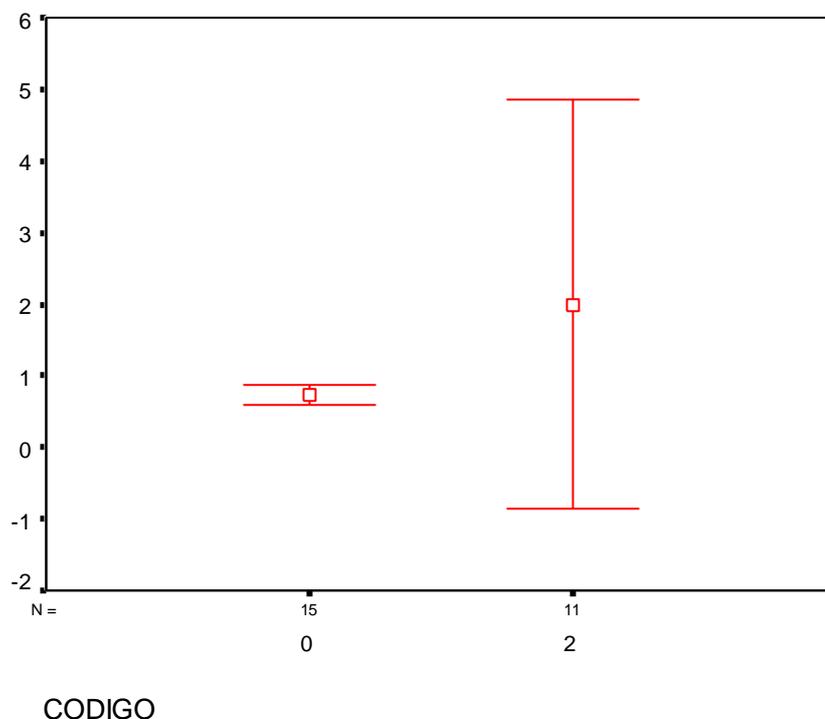


Gráfico 6.- Medias y dispersión del grupo control (0) y del grupo diabético que ha sufrido un evento isquémico (2). No se establecen diferencias estadísticamente significativas al aplicar el Test de Student para igualdad de medias y test de Levene para igualdad de varianza con un intervalo de confianza del 95%.

V.2.- NIVELES DE sCD62p y CD40L MEDIANTE E.L.I.S.A.

Se utilizaron como marcadores de activación plaquetaria los AcMo anti sCD62p y anti CD40L.

En los gráficos 7 y 8 no se visualizan diferencias significativas entre los cuatro grupos analizados, si bien el grupo con la doble condición mostró los valores más elevados.

Como los valores de sCD40L obtenidos de la muestra de la integrante del grupo control número 20 está muy alejado de la media del grupo fue excluida para realizar los cálculos.

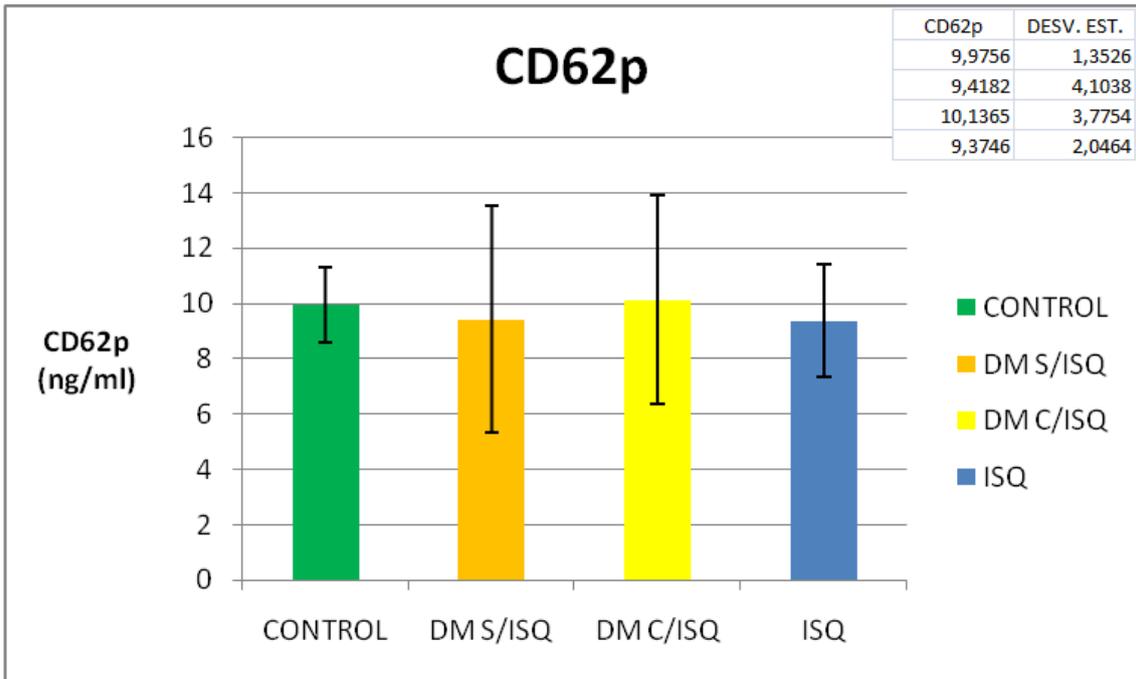


Gráfico 7.- Promedios de las medias y desvío estándar de activación plaquetaria para cada grupo medidas con sCD62p en ng/mL.

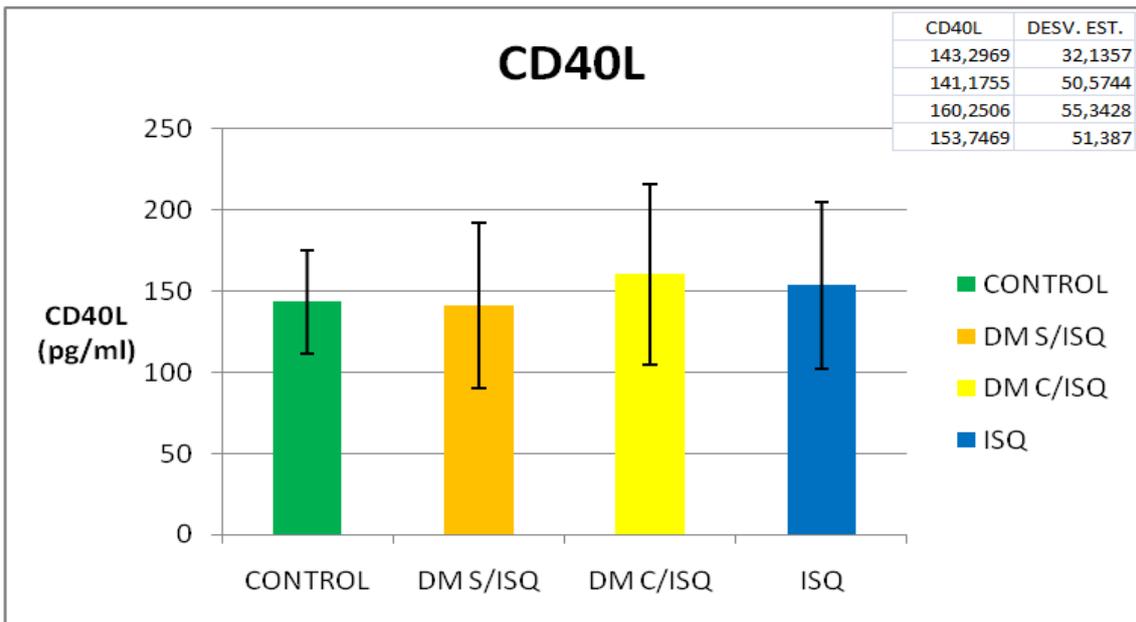


Gráfico 8.- Promedios de las medias y desvío estándar de activación plaquetaria para cada grupo medidas con CD40L en pg/mL.

Los gráficos 9 y 10 muestran que para los marcadores utilizados para la técnica de ELISA no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (presencia ó ausencia de evento isquémico).

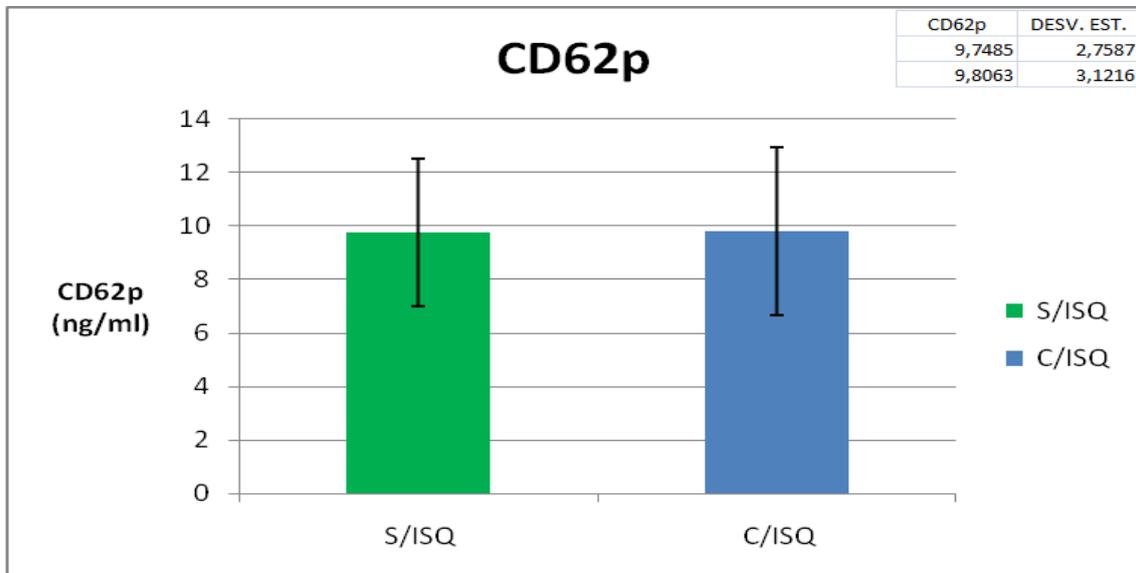


Gráfico 9.- Promedios de las medias y desvío estándar de activación plaquetaria para los pacientes con y sin evento isquémico medidas con sCD62p en ng/mL.

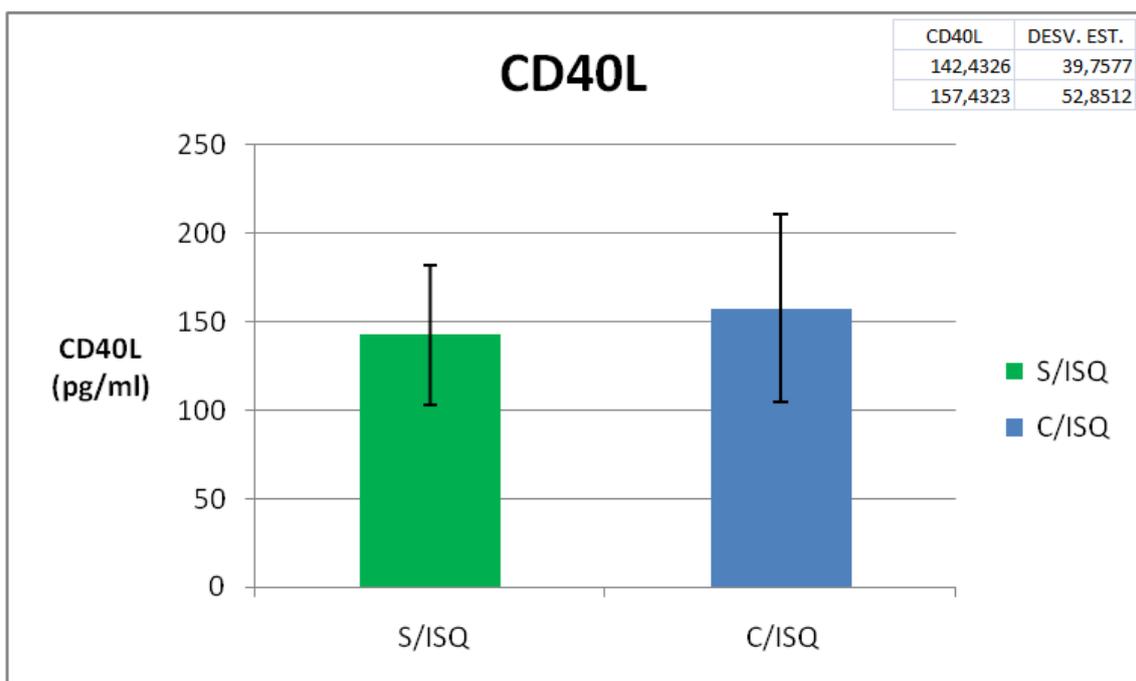


Gráfico 10.- Promedios de las medias y desvío estándar de activación plaquetaria para los pacientes con y sin evento isquémico medidas con CD40L en pg/mL.

En los gráficos 11, 12, 13 y 14 se observan que los marcadores adquieren un comportamiento diferente en los grupos de acuerdo al sexo seleccionado. Mientras que para CD62p es mayor en mujeres sin evento isquémico que las que si lo padecieron en los hombres es mayor los que si padecieron el evento que los que no (Gráficos 11 y 12). En cambio los patrones se invierten completamente para el marcador CD40L (Gráficos 13 y 14).

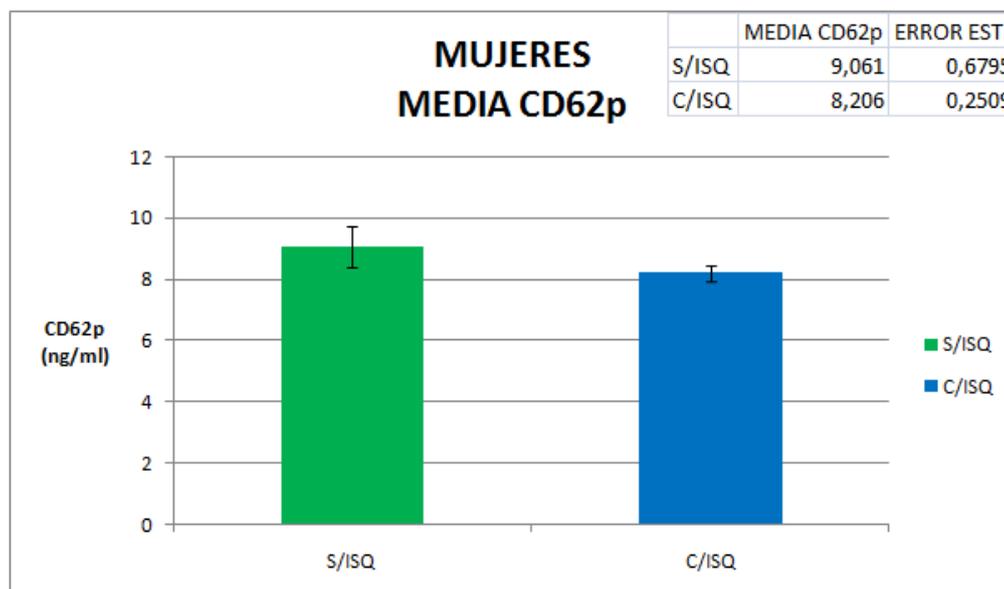


Gráfico 11.- Promedios de las medias y error estándar para las integrantes del sexo femenino agrupadas de acuerdo a la ocurrencia ó no de evento isquémico medidos con CD62p en ng/mL.

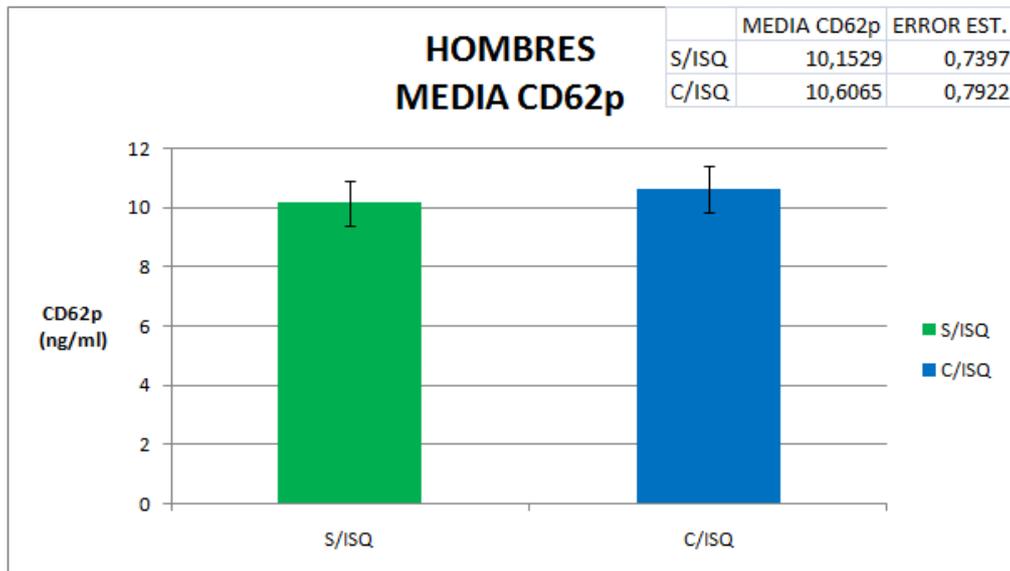


Gráfico 12.- Promedios de las medias y error estándar para los integrantes del sexo masculino agrupados de acuerdo a la ocurrencia ó no de evento isquémico medidos con CD62p en ng/mL.

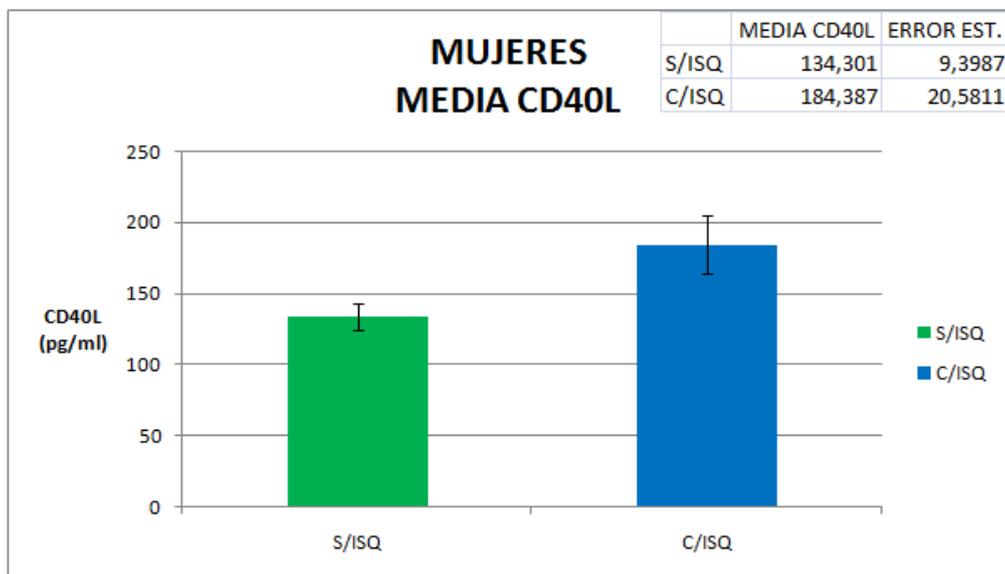


Gráfico 13.- Promedios de las medias y error estándar para las integrantes del sexo femenino agrupadas de acuerdo a la ocurrencia ó no de evento isquémico medidos con CD40L en pg/mL.

En el gráfico 13 se visualiza diferencias estadísticamente significativas entre mujeres isquémicas y no isquémicas. Se obtuvo un $p= 0.023$ unilateral para un nivel de significancia de 0.05 ($n=10$ para ambos grupos).

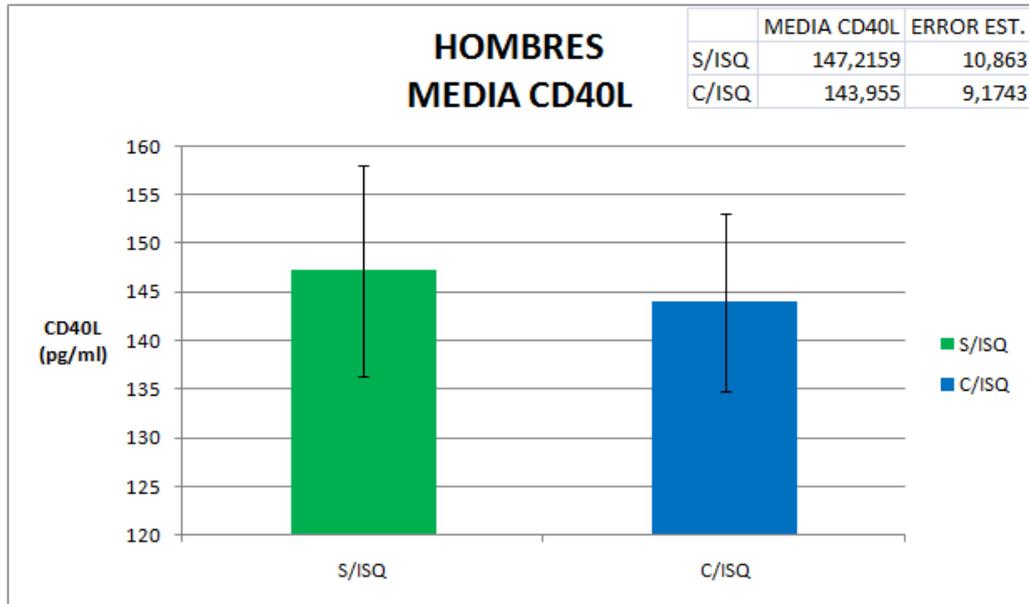


Gráfico 14.- Promedios de las medias y error estándar para los integrantes del sexo masculino agrupados de acuerdo a la ocurrencia ó no de evento isquémico medidos con CD40L en pg/mL.

En los gráficos 15 y 16 se observan diferencias estadísticamente significativas al contrastar las mujeres y los hombres con evento isquémico documentado para ambos marcadores solubles. En el caso de sCD62 se obtuvo un $p= 0.004$ unilateral con un I.C. del 95%. (Gráfico 15) y para sCD40L un $p= 0.045$ unilateral (Gráfico 16) ($n=10$ y $n=20$ respectivamente).

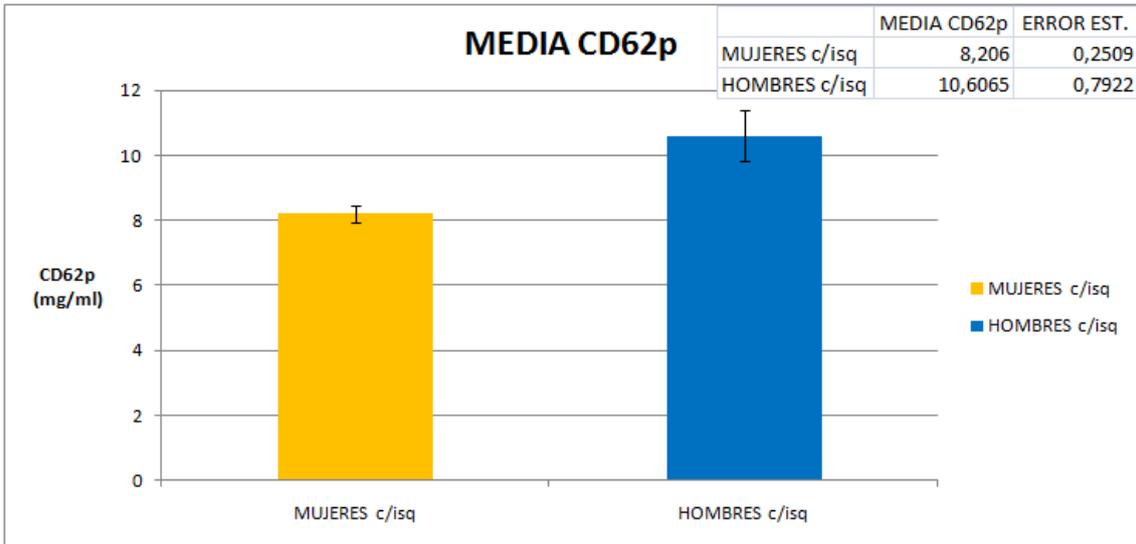


Gráfico 15.- Promedios de las medias y error estándar para las mujeres y hombres que han padecido un evento isquémico medidos con CD62p en ng/mL.

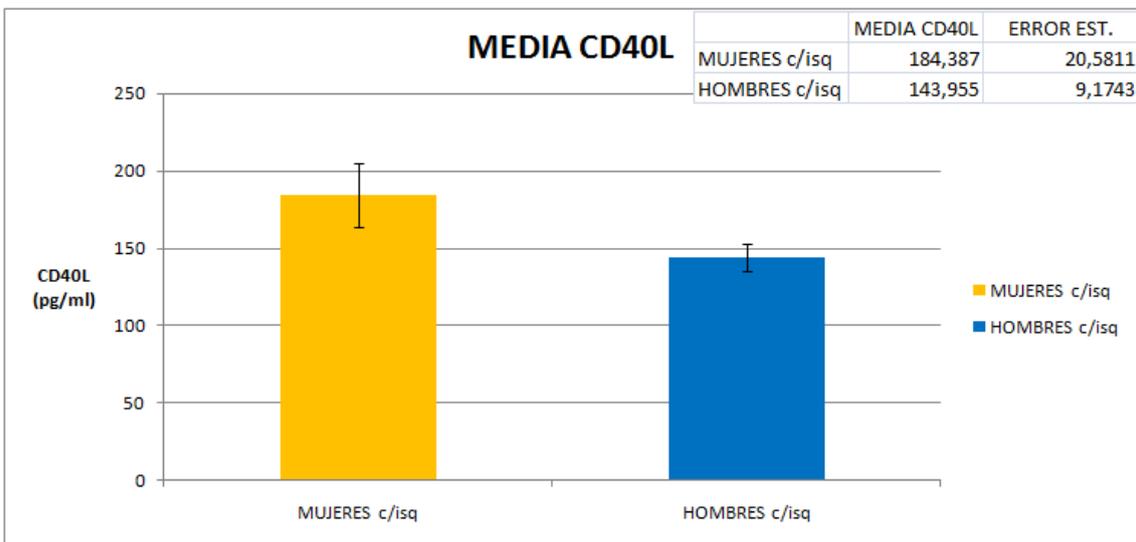


Gráfico 16.- Promedios de las medias y error estándar para las mujeres y hombres que han padecido un evento isquémico medidos con CD40L en pg/mL.

V.3.- ANALISIS COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA AMBAS TECNICAS PARA LOS NIVELES DE CD62p

El gráfico 17 muestra la correlación existente entre ambas isoformas de la molécula de CD62p para todos los individuos a los cuales se le puede aplicar ambas técnicas. Cada punto representa la muestra del mismo paciente evaluada por citometría de flujo (mCD62p) y E.L.I.S.A (sCD62p). La pendientes de las curvas visualizadas es aproximadamente 0 lo cual indica ausencia de correlación. De acuerdo a estos resultados no existiría correlación entre las isoformas de CD62p.

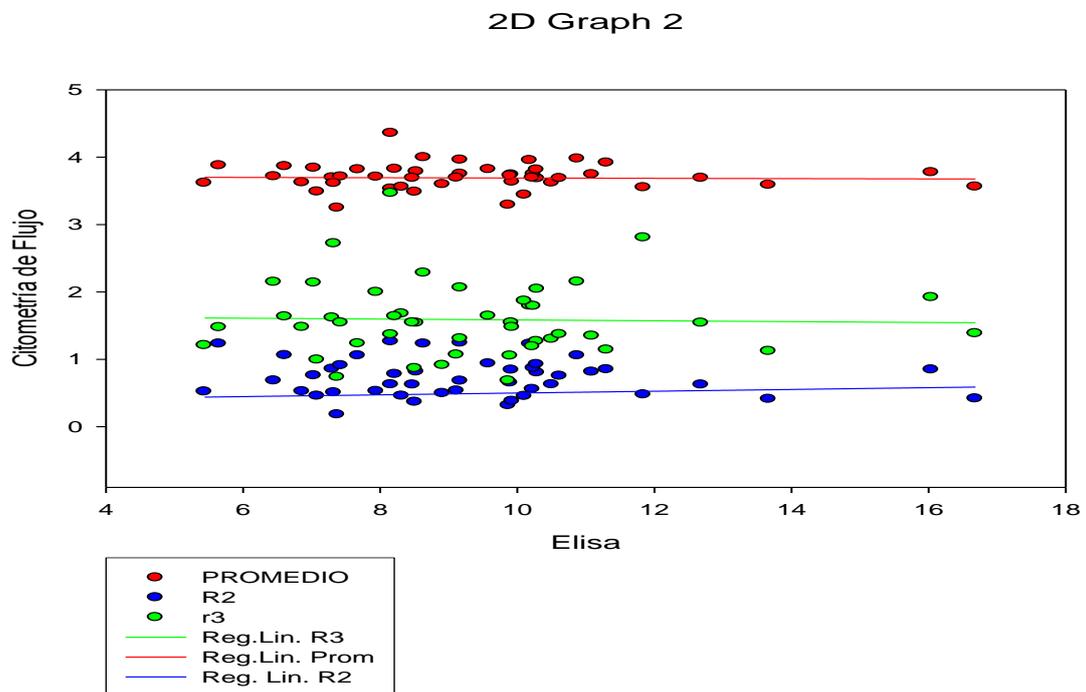


Gráfico 17.- Correlación de ambas técnicas para la región R2, R3 y promedio de media, obtenidas mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

VI.- DISCUSIÓN

La principal causa de muerte en los países desarrollados son los eventos cardiovasculares (Serebruany et al, 2008). En nuestro país, murieron 10.550 personas en el año 2007 y 9.582 en el 2008 por esta causa de acuerdo a los datos obtenidos en el Ministerio de Salud Pública, siendo la incidencia mayor en individuos mayores de 65 años. Estos números equivalen aproximadamente a un 31% de las muertes totales (http://www.msp.gub.uy/uc_3791_1.html; consultada en el año 2010). Además, los procesos aterotrombóticos son causa de diferentes patologías, disminuyendo la calidad de vida y encareciendo el gasto en el Sistema de Salud.

La aumentada activación y reactividad plaquetaria son un mecanismo crucial en la trombogénesis arterial y preceden al desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Marquardt et al., 2002). Por lo tanto, la determinación de un buen marcador de activación plaquetaria sería de gran relevancia como forma predictiva y preventiva de un posible evento cardiovascular.

Si bien existen una gran diversidad de estudios sobre marcadores de activación plaquetaria (Jennings,1986; George, 1986; Ruf, 1997; Tschoepe, 1997; Tomer, 1999; van Kooten, 1999; Vitale, 2001; Marquardt, 2002; Ferroni, 2004; Yip,2004; Angiolillo, 2006; Yip, 2006; Osmancik, 2007; Serebruany, 2008; Tsai, 2009), ya sea con un fin diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico, en la actualidad no se ha verificado la existencia de un marcador totalmente fiable.

Se analizaron grupos de pacientes diabéticos con y sin isquemia, pacientes isquémicos no diabéticos e individuos controles utilizando las técnicas anteriormente citadas. Se estratificó por sexos y se aplicaron los test estadísticos

correspondientes para cada caso. Por último, se intentó visualizar la existencia de correlación entre las dos isoformas de la molécula de CD62p.

VI.1 SELECCIÓN DE GRUPOS

Está bien establecido el aumento del riesgo que poseen los diabéticos de producir un evento cardiovascular. En su mayoría, estos pacientes, sufren de complicaciones macro y microvasculares tales como nefro-, neuro- y retinopatías, que afectan su morbimortalidad. A estas patologías se les suman eventos trombóticos fatales. El riesgo para desarrollar enfermedad coronaria aumenta de 2 a 3 veces en el estado prediabético de intolerancia a la glucosa y asciende a 4 en pacientes diabéticos que exhiben una elevada actividad de agregación, fenómeno que surge tempranamente en el curso de la enfermedad (Tschoepe et al., 1997; Plutzky et al., 2002; Hsueh, 2003; Ferroni, 2004, Neubauer et al., 2010). Considerando estas características, este tipo de pacientes podría ser un buen grupo para analizar la activación plaquetaria, y así fue planteado en el diseño experimental de esta tesis. A su vez, se seleccionaron pacientes que habían sufrido una cardiopatía isquémica que presentaran ó no diabetes, con el fin de vislumbrar si existiera también alguna diferencia entre estos grupos.

VI.2 ANALISIS ESTADISTICO

VI.2.1 ANALISIS DE LOS CUATRO GRUPOS EXPERIMENTALES

En el análisis realizado por citometría de flujo se visualiza un claro aumento en la marcación con mCD62p para los pacientes con la doble condición (diabetes y cardiopatía isquémica) Sin embargo no se observan notables diferencias entre los grupos restantes (Gráficos 1 y 2). Estos resultados muestran que las plaquetas de

los pacientes con la doble condición poseen un mayor porcentaje de mCD62p. Este incremento estaría brindando a las plaquetas una mayor adhesividad y por lo tanto un mayor potencial de agregación que en el resto de los pacientes. Como consecuencia, estos pacientes tendrían mayor probabilidad de producir un nuevo evento cardiovascular. Sin embargo estos resultados no tienen grado de significación estadística.

En el análisis realizado por ELISA para los marcadores sCD62p y CD40L no se visualizan diferencias significativas en los cuatro grupos analizados, si bien también el grupo con la doble condición mostró los valores más elevados (Gráficos 7 y 8).

VI.2.2 ANALISIS DE LOS GRUPOS CON Y SIN CARDIOPATIA ISQUEMICA

Considerando los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Soto et al. (2004) en el cual el hecho de ser diabético no altera la asociación entre hiperhomocistinemia (factor de riesgo) y la cardiopatía isquémica, se reunieron a los pacientes en dos grupos: con y sin cardiopatía sin importar el estado diabético (Gráficos 3, 4, 9 y 10). En citometría de flujo se observa una clara diferencia entre ambos grupos (Gráficos 3 y 4). En este caso, el marcador mCD62p evidenció que la media obtenida para el grupo que ha sufrido una cardiopatía isquémica es casi el doble que el grupo que no ha tenido un evento isquémico tanto para la región Q-UR R2 (Gráfico 3) como para la región Q-UR R3 (Gráfico 4). Si bien se observó esa diferencia en ambos grupos, no existe una diferencia estadísticamente significativa al aplicar el test de Student para igualdad de medias con un intervalo de confianza (I.C.) del 95%. Este hecho puede explicarse por la gran heterogeneidad evidenciada por la elevada dispersión en los valores observada en el grupo con la doble

condición (Gráfico 6). En contraste no se observaron los mismos resultados para los dos marcadores utilizados con ELISA (Gráfico 9 y 10).

VI.2.3 ANÁLISIS ESTRATIFICADO POR SEXOS

El análisis realizado por citometría de flujo a los distintos grupos estudiados estratificando por sexos no mostró ningún resultado con significación estadística.

Al realizar el análisis estratificando los grupos por sexos para los marcadores utilizados para la técnica de ELISA se observó una inversión en los valores. En el caso de sCD62p, en el sexo femenino la marcación es mayor para las pacientes sin evento isquémico que las que sí lo padecieron (Gráfico 11). En el masculino, en cambio, la marcación es mayor en los individuos que han sufrido un evento isquémico (Gráfico 12). En cuanto a los valores de sCD40L, se observó que las mujeres con evento isquémico previo mostraron valores más altos (Gráfico 13) mientras que en los hombres la marcación fue mayor en los casos sin antecedentes de evento isquémico (Gráfico 14). Este análisis descriptivo y lo aportado por el trabajo de Leslee et al. (2009) condujo a evaluar si habría diferencias en los grupos de acuerdo a cada sexo.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al contrastar las mujeres y los hombres con evento isquémico documentado para ambos marcadores solubles. Se aplicó el test de Levene para igualdad de varianzas y el test de Student para igualdad de medias con un I.C. del 95%. En el caso de sCD62 se obtuvo un **p= 0.004** unilateral (Gráfico 15) y para sCD40L un **p= 0.045** unilateral (Gráfico 16) (n=10 y n=20 respectivamente). Así como John Gray en su célebre libro “Los hombres de Marte, las mujeres son de Venus” mediante estereotipos psicológicos describe variadas diferencias existentes entre ambos sexos, estos

resultados ponen también de manifiesto que existen diferencias significativas entre los sexos, y por ende debería considerarse cuál es el marcador óptimo de activación plaquetaria a utilizar en cada caso. Más aun, aplicando los mismos test antedichos para sCD40L entre mujeres isquémicas y no isquémicas se obtuvo un **p= 0.023** unilateral (Gráfico 13) (n=10 para ambos grupos). Esto podría estar indicando que este último marcador es más sensible en mujeres que en hombres.

Existe un intenso “*crosstalk*” (intercomunicación) entre las plaquetas y los componentes celulares y plasmáticos del sistema inflamatorio (Marquardt et al., 2002). La inflamación es una clave importante en la patogénesis de la aterosclerosis y la inestabilidad de la placa y ya se ha hecho evidente en varias patologías ateroscleróticas (Gawaz et al., 2005; Neubauer et al., 2010). La secreción de CD40L tiene un importante rol en el proceso inflamatorio (Henn et al., 1998). Por lo tanto, sería recomendable integrar en los criterios de exclusión del grupo control la evaluación de algún mediador potente de la inflamación como podría ser la proteína C reactiva, TNF alfa, o alguna interleuquina como IL-1. También es conocido el hecho que en su etapa reproductiva el sexo femenino es más propenso a procesos inflamatorios, ya sea por su perfil hormonal o por tener una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes relacionadas con la inflamación. La inflamación está asociada a la disfunción microvascular y ésta a la disfunción endotelial la cual está íntimamente ligada a la activación plaquetaria (Rider et al., 2001; Leslee et al., 2009).

VI.2.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA mCD62p y sCD62p

La molécula de mCD6p es la que determina y estabiliza el agregado plaquetario (Merten y Thiagarajan, 2000) Luego de la activación plaquetaria mCD6p es

secretada al plasma sanguíneo perdiendo el dominio transmembrana pero conservando el mismo epítipo que reconoce al ligando de la mCD62p (Ushiyama et al., 1993; Michelson et al., 1996; Gurney et al., 2002). Esta forma soluble de la selectina-P no es un mero producto de degradación sino que podría actuar como inhibidor compitiendo con la proteína de membrana en su interacción con los receptores (Gamble et al., 1990; Penella, 2008). sCD62p inhibe selectivamente la adhesión de los neutrófilos al endotelio, por lo cual la administración terapéutica de sCD62p podría usarse para diversas patologías vasculares como agente antitrombótico (Gamble et al., 1990). Utilizando inhibidores específicos y de su ligando se ha demostrado su eficacia antitrombótica en modelos animales. Como contrapartida, se ha sugerido que el potencial procoagulante de esta selectina podría utilizarse para el tratamiento de enfermedades hemorrágicas tales como la hemofilia (Penella, 2008). Por lo tanto, ya sea soluble o en membrana, es de esperar la obtención de buenos resultados en relación a terapias antitrombóticas y/o antihemorrágicas (Chong et al., 1994; Blann et al., 2003; Yip et al., 2006; Penella, 2008).

En la bibliografía existen trabajos que plantean como marcador de activación tanto a sCD62p (ej.: Ferroni et al., 1999, 2008; Chong et al., 1994; Blann y Lip 1997) como otros que proponen a la selectina-P de membrana (ej: Michelson 1996; Michelson et al., 2000; Pearson et al., 2008; Mobarrez et al., 2009). Si bien existen muchos trabajos en el tema, no existe en la actualidad ningún estudio que haya obtenido resultados de ambas moléculas con las muestras obtenidas de los mismos pacientes.

Con el fin de visualizar si existe una relación entre los dos estados de la molécula de selectina-P, y profundizar el conocimiento sobre este sistema se analizaron los

resultados obtenidos mediante la correlación de Pearson. No se observó relación aparente (Gráfico 17).

VI.3 ANALISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y LOS DATOS

CLINICOS DE LOS PACIENTES

De acuerdo a los datos de la historia clínica de los pacientes proporcionada por el equipo médico se visualizaron las siguientes particularidades:

- Los valores más alterados se observaron en pacientes que presentaron cardiopatía isquémica severa (coincidente con los resultados obtenidos por Osmančik y colaboradores en el 2007) y que han requerido revascularización tanto quirúrgica como por angioplastia. Coincide otro aspecto que consiste en su mayor medicación por la suma de otros factores de riesgo (probablemente con dosis mayores de cada fármaco).
- Las cardiopatías isquémicas de larga data como por ejemplo de más de 10 años parecerían ser más estables, por lo tanto el tiempo transcurrido desde la ocurrencia del evento isquémico podría tener relevancia.
- La medicación relacionada con la diabetes era similar en todos los pacientes seleccionados. Los fármacos directamente involucrados con la activación y agregación plaquetaria fueron suspendidos antes del estudio. Los pacientes dislipidémicos están controlados con diversos fármacos por lo cual quizás debería considerarse dentro del criterio de exclusión a los pacientes medicados con estantinas. Existen evidencias de los efectos de las diversas estantinas como factores protectores en la prevención de los eventos coronarios en pacientes diabéticos (Seljeflot et al., 2002; Brandle et al., 2003) por lo cual podría estar actuando como un factor de distorsión.

- Se verifica también que en general los valores van en aumento acorde al aumento en edad.
- Si bien en los criterios de exclusión se consideró el recuento de las WBC como forma de evaluar una posible infección, como se realiza en la mayoría de los trabajos científicos, se debería tener en cuenta algún marcador de inflamación.

VI.7 CONSIDERACIONES FINALES

Hay que tener en cuenta algunas de las razones por las cuales existe una gran dificultad en conseguir pacientes con la historia clínica requerida para pertenecer a cada grupo seleccionado para el análisis.

1. *Suspensión de la medicación:* el reclutamiento de pacientes que puedan suspender la medicación antiagregante plaquetaria por el plazo previamente establecido puede llegar a ser una limitante importante.
2. *Edad en padecer diabetes mellitus tipo II:* generalmente este tipo de diabetes se desarrolla en edades avanzadas lo cual dificulta hallar controles para ser pareados por edad. La mayor proporción de la población en esa franja etaria posee uno a más factores de exclusión.
3. *Incidencia diferencial:* La incidencia de las enfermedades coronarias es mayor en hombres que en mujeres por lo cual el número de mujeres para los casos es más reducido.
4. *Costos elevados:* el elevado costo de los kits de ELISA y anticuerpos para citometría de flujo reduce el número de individuos que se pueden evaluar.
5. La naturaleza multifactorial de estas patologías y el largo tiempo que frecuentemente precede a la aparición de ellas, muchas veces dificulta su estudio

Estas son algunas de las razones por las cuales resulta dificultoso el reclutamiento de un número elevado de individuos. Si bien el N utilizado en la presente tesis no es el adecuado para establecer asociaciones robustas, es el comienzo para seguir investigando al respecto y conseguir fondos que posibiliten un nuevo estudio con un número mayor de individuos.

VII.- CONCLUSIONES

La molécula de CD62p y la interacción con su ligando representa un importante mecanismo potenciador de la hemostasia a través del cual se generan micropartículas procoagulantes que son incorporadas al trombo en formación. Se ha intentado validar los niveles de la selectina-P como un marcador de riesgo cardiovascular y trombótico, aunque por el momento los resultados no son totalmente concluyentes.

En nuestro país existen varios citómetros de flujo. Sin embargo, en ningún laboratorio se había analizado la activación plaquetaria anteriormente. Por lo tanto, es la primera vez en Uruguay que se realiza un ensayo clínico sobre activación plaquetaria y se utiliza un citómetro de flujo con este fin.

En este trabajo de tesis se encontró:

- a) La citometría de flujo refleja cambios en la molécula de mCD62p en los distintos grupos analizados sin encontrar significación estadística
- b) Los ensayos de E.L.I.S.A. reflejan los cambios en los valores de sCD62p y CD40L con significación estadística al contrastar ambos sexos
- c) El marcador CD40L resultó ser más sensible para el sexo femenino que para el sexo masculino

- d) No habiendo antecedentes sobre la evaluación de la molécula de CD62p en sus dos formas isoméricas en el mismo grupo de individuos en este trabajo no se encontró relación aparente entre ambos estados de la misma molécula
- e) Se debe considerar el sexo a estudiar en relación al marcador de activación plaquetaria a utilizar ya que se visualizó un dimorfismo sexual.
- f) Es necesario estrechar aún más los factores de inclusión para cada grupo a analizar.
- g) Los resultados de la presente tesis no son concluyentes en cuanto a si la molécula de CD62p es un buen marcador de activación plaquetaria pero pretenden ser un punto de partida de futuras investigaciones.

VIII.- PERSPECTIVAS

La posibilidad de encontrar un punto de corte para el riesgo de un evento cardiovascular entre ambas poblaciones brindaría nuevas esperanzas en la prevención y tratamiento de pacientes en una amplia gama de patologías. Además, con la obtención de ese punto se podrían establecer asociaciones con algunas patologías y asociaciones con algunos polimorfismos encontrados en los genes de las selectinas y sus ligandos. Adicionalmente, algunas de las variaciones genéticas podrían aportar nuevos datos asociando determinados haplotipos con dicho riesgo. El posible trabajo con emergencias móviles en la recolección de muestras de pacientes en agudo brindaría un buen marco referencial para encontrar dicho punto de corte.

Siendo CD62p (soluble o en membrana) un producto plaquetario, sería de esperar buenos resultados frente a la influencia de terapias antitrombóticas y/o antihemorrágicas. CD62p puede ser utilizado, entonces, como: a) marcador de la

actividad plaquetaria a nivel de membrana; b) marcador plaquetario a nivel plasmático; c) molécula predictiva de posibles patologías y; c) posible blanco terapéutico.

Muchas interrogantes quedan aún por responder tales como: a) mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de dichos marcadores; b) inducción de su proteólisis, qué vías de señalización intervienen en la generación de micropartículas procoagulantes y; c) individualizar alteraciones genéticas relevantes y su repercusión funcional.

Por último el desarrollo de estrategias terapéuticas moduladoras de la hemostasia es un reto científico y un campo prometedor que está en la actualidad en su fase inicial de desarrollo.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad S, Phillips D (2002) "Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease" *Circulation* 106: 896-899.

Angiolillo D, Bernardo E, Ramírez C, Costa M, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Bass T, Macaya C, Fernandez-Ortiz A (2006) "Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with Type 2 Diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment". *Journal American College. Cardiology* 48: 298-304.

Barboux S, Blankenberg S, Rupprecht H, Francomme C, Bickel C, Hafner G, Nicaud V, Meyer J, Cambien F, Tiret L (2001) "Association Between P-Selectin Gene Polymorphisms and Soluble P-Selectin Levels and Their Relation to Coronary Artery Disease" *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21:1668-1673.

Bermejo E, Alberto M, Meschengieser S, Lazzari M (2004) "Assessment of platelet activation in myeloproliferative disorders with complementary techniques" *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 15: 235-240.

Bizzozero G (1881) "Ueber einer neuen Formbestandtheil-Blutes und Desser Role bei der Thrombose und der Blutg erinnerung". *Archives of Pathology, Anatomy and Physiology* 90: 261-269. Citado por Michelson, 1996, Gazzaniga, 2001; Caunedo P 2004.

Blann A, Lip G (1997) "Hypothesis: Is soluble P-selectin a new marker of platelet activation?". *Atherosclerosis* 128:135–138.

Blann A, Nadar S, Lip G (2003) "The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease". *European Heart Journal* 24: 2166–2179.

Brandle M, Davidson M, Schriger D, Lorber B, Herman W (2003) "Cost effectiveness of statin therapy for the primary prevention of major coronary events in individuals with type 2 diabetes" *Diabetes Care* 26: 1796-1801.

Calvete J (1999) "Platelet Integrin GPIIb/IIIa: Structure-Function Correlations. An Update and Lessons from Other Integrins" *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222: 29-38.

Caunedo P (2004) "La citometría de flujo en el estudio de las plaquetas". *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 20:1.

Chandler A, Earhart A, Speich H, Kueter T, Hansen J, White M, Jennings L (2009) "Regulation of CD40L (CD154) and CD62P (p-selectin) surface expression upon GPIIb-IIIa blockade of platelets from Stable Coronary Artery Disease patients". *Thrombosis Research* 125: 44-52.

Chong B, Murray B, Berndt M, Dunlop L, Brighton T, Chesterman C (1994) "Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders". *Blood* 83: 1535–1541.

Choudhury A, Chung I, Panja N, Patel J, Lip G (2008) "Soluble CD40 Ligand, platelet surface CD40 Ligand, and total platelet CD40 Ligand in Atrial Fibrillation: Relationship to soluble P-selectin, Stroke risk factors, and risk factor intervention" *Chest* 134: 574-581.

Dunlop L, Skinner M, Linda J, Benda L, Favalaro E, Castaldi P, Gorman J, Gamble J, Vadas M, Berndt M (1992) "Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a Circulating Plasma Protein". *The Journal of Experimental Medicine* 175: 1147-1150.

Engvall E (2010) "The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay". *Clinical Chemistry* 56:2 319-320.

Ferroni P, Pulcinell F, Lenti L, Gazzaniga P (1999) "Is soluble P-selectin determination a more reliable marker of in vivo platelet activation than CD62P flow cytometric analysis?". *Thrombosis and Haemostasis* 81: 472-473.

Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G (2004) "Platelet activation in type 2 diabetes mellitus". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2: 1282-1291.

Ferroni P, Martini F, Riondino S, La Farina F, Magnapera F, Ciatti F, Guadagni F (2008) "Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation". *Clinica Chimica Acta* 399: 88-91.

Fijnheer R, Frijns C, Korteweg J, Rommes H, Peters J, Sixma J, Nieuwenhuis H (1997) "The origin of P-selectin as a circulating plasma protein." *Thrombosis and Haemostasis* 77: 1081-1085. Citado en Ferroni et al, 1999 , Gurney et al., 2002, Blann et al., 2003 y Ferroni et al., 2008.

Florensa L, Coll M, Woessner S (2001) "Hematopoyesis. Morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos" En "Hematología clínica" Sans- Sabrafen J, Vives Corrons J (eds.) Editorial HArcourt 5ta edición España 1: 1-35.

Furman M, Krueger L, Linden M, Barnard M, Frelinger A, Michelson A (2004) "Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization". *Journal of the American College of Cardiology* 43: 2319-2325.

Gamble J, Skinner M, Berndt M, Vadas M (1990) "Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP-140". *Science New Serie* 249: 414-417.

Gawaz M, Langer H, May A (2005) "Platelets in inflammation and atherogenesis". *The Journal of Clinical Investigation* 115: 3378-3384.

Gazzaniga V, Ottini L (2001) "The discovery of platelets and their function". *Vesalius* 7(1): 22-26.

George J, Pickett E, Saucerman S, McEver R, Kunicki T, Kieffer N, Newman P (1986) "Platelet surface glycoproteins: studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress síndrome and cardiac surgery". *Journal Clinical Investigation*. 78: 340-348.

Guerrero R, Echeverri E, Rueda J, González H (2005). "Moléculas coestimuladoras y artritis reumatoide". *Revista Colombiana de Reumatología*. Vol 12 N° 1: 44-52.

Gurney D, Lip G, Blann A (2002) "A reliable plasma marker of platelet activation: does it exist?" *American Journal of Hematology* 70:139-144.

- Gray J (1992) "Los hombres son de Marte y las mujeres de Venus" Pub.: Harper Collins
- Henn V, Slupsky J, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck R (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells" *Nature* 391: 591-594.
- Hsueh W (2003) "Introduction: New insight into understanding the relation of type 2 Diabetes Mellitus, insulin resistance, and cardiovascular disease". *The American Journal of Cardiology* 92(4A): 1-2.
- Isenberg W, McEver R, Shuman M, Bainton D (1986). "Topographic distribution of a granule membrane protein (GMP-140) that is expressed on the platelet surface after activation: an immunogold-surface replica study". *Blood Cells* 12:191–204.
- Jennings L, Ashmun R, Wang W, Dockter M (1986) "Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry". *Blood* 68(1): 173-179.
- Kansas G (1996) "Selectins and their ligands: current concepts and controversies". *Blood*; 88:3259–87.
- Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J (2004) "Harrison's Principles of Internal Medicine". 16th edition Berkshire: Edit. McGraw-Hill Book Company; 1073-1194.
- Leslee J, Bugiardini R, Bairey Merz C (2009) "Women and ischemic heart disease: evolving knowledge" *Journal of the American College of Cardiology* 54: 1561-1575.
- Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, Winter R, Schuler M, Buggle F, Mayer H, Grau A (2002) "Course of platelet activation markers after ischemic stroke". *Stroke* 33: 2570-2574.
- Martínez M., Ruiz-Aja S, Aznar J (2005) "Utilidad Clínica de la Citometría de Flujo para valorar la Activación Plaquetaria en distintas patologías". *Revista de Diagnóstico biológico* 54(1): 15-25.
- Mateo J, Santamaría A, Borrell M, Souto J, Fontcuberta J (2006), "Fisiología y exploración de la hemostasia". En "Hematología clínica", Sans-Sabrafen J, Vives Corrons J, (eds.) Editorial Elsevier-Masson 5^{ta} edición 33: 659-680.
- Mateo J, Santamaría A, Borrell M, Souto J, Fontcuberta J (2001), "Trombosis e hipercoagulabilidad". En "Hematología clínica", Sans-Sabrafen J, Vives Corrons J, (eds.) Editorial HARCourt 5^{ta} edición 37: 675-686.
- Merten M, Thiagarajan P (2000) "P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates". *Circulation* 102(16): 1931-1936.
- Michelson A (1996) "Flow cytometry: a clinical test of platelet function". *Blood* 87: 4925-4936.
- Michelson A, Barnard M, Hecxhtman H, MacGregor H, Connolly R, Loscalzo J, Valeri C (1996) "In vivo tracking of platelets: Circulating degranulated platelets rapidly lose surface P selectin but continue to circulate and function". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11877–11882.

- Michelson A, Barnard M, Krueger L, Frelinger A, Furman M (2000) "Evaluation of platelet function by flow cytometry". *Methods* 21: 259-270.
- Mobarrez F, Antovic J, Egberg N, Hansson M, Jömeskog G, Hultenby K, Wallén H (2009) "A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles". *Thrombosis Research* 125: 110-116.
- Monteiro M-do-C, Martínez M, O'Connor J (2002) "La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas. Aplicaciones clínicas". *Revista Diagnóstico Biológico* 51: 3.
- Neubauer H, Setiadi P, Günesdogan B, Pinto A, Börgel J, Mügge A (2010) "Influence of glycaemic control on platelet bound CD40-CD40L system, P-selectin and soluble CD40 ligand in Type 2 diabetes". *Diabetic Medicine* 27: 384-390.
- Osmancik P, Bednar F, Móciková H (2007) "Glycemia, triglycerides and disease severity are best associated with higher platelet activity in patients with stable coronary artery disease". *Journal Thrombosis Thrombolysis* 24: 105-107.
- Psaty B, Arnett D, Burke G (2007) "A new era of cardiovascular disease epidemiology". *The Journal of American Medical Association* 298(17): 2060-2062.
- Pearson L, Thom J, Adams M, Oostryck R, Krueger R, Yong G, Baker R (2008) "A rapid flow cytometric technique for the detection of platelet-monocyte complexes, activated platelets and platelet-derived microparticles". *International Journal of Laboratory Hematology* 31: 430-439.
- Peitsch P, Stampf D, Wells T, Sussman J (1995) "The swiss-3D image collection and PDB-browser on the world-wide web" *Trends in Biochemical Sciences* 20: 82-84
- Penella T (2008) "Las selectinas como nuevos determinants en la coagulación". *Haematologica* 93: 155-161.
- Plutzky J, Viberti G, Haffner S (2002) "Atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus and insulin resistance: mechanistic links and therapeutic targets". *Journal of Diabetes and Its Complications* 12: 401-415.
- Rider V, Jones S, Evans M, Bassiri H, Afsar Z, Abdou N (2001) "Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus". *The Journal of Rheumatology* 28: 2644-2649.
- Ruf A, Pick M, Deutsch V, Patscheke H, Goldfarb A, Rachmilewitz E, Guillin M, Eldor A (1997) "In-vivo platelet activation correlates with red cell anionic phospholipid exposure in patients with β -thalassaemia major". *British Journal of Haematology* 98: 51-56.
- Schmidt V, Hilberg T (2006) "ThromboFix™ Platelet Stabilizer: Advances in clinical platelet analyses by flow cytometry?" *Platelets* 17: 266-273.
- Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson K, Goodall A, Michelson A, Nurden A, Shankey T (1998) "European working group on clinical analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function". *Thrombosis and Haemostasis* 79: 885-896.
- Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker P (2001) "Soluble CD40L and cardiovascular risk in women". *Circulation* 104: 2266-2268.

- Seljeflot I, Tonstad S, Hjermmann I, Arnesen H (2002) "Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease" *Atherosclerosis* 162: 179–185.
- Sellam J, Proulle V, Jünger A, Ittah M, Richard C, Gottenberg J, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet J, Mariette X (2009) "Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren`s syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity". *Arthritis Research & Therapy* 11:5: R156.
- Serebruany V, Malinin A, Ong S, Atar D (2008) "Patients with metabolic syndrome exhibit higher platelet activity than those with conventional risk factors for vascular disease". *Journal Thrombosis Thrombolysis* 25: 207-213.
- Shattil S, Hoxie J, Cunningham M, Brass F (1985) "Changes in the Platelet Membrane Glycoprotein IIb IIIa Complex during Platelet Activation". *The Journal of Biological Chemistry* 260(20): 11107-11114.
- Shattil S, Cunningham M, Hoxie J (1987) "Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry". *Blood* 70: 307-315.
- Sheremata W, Jy W, Horstman L, Ahn Y, Alexander J, Minagar A (2008) "Evidence of platelet activation in multiple sclerosis". *Journal of Neuroinflammation* 5: 27.
- Soto E, Mimbacas A, Gascue C, Javiel G, Ferrero R, Vitarella G, Cardoso H (2004) "Asociación entre hiperhomocisteinemia, cardiopatía isquémica y diabetes tipo 2" *Revista Uruguaya de Cardología* 19: 81-87.
- Takeda I, Kaise S, Nishimaki T, Kasukawa R (1994) "Soluble P-selectin in the plasma of patients with connective tissue diseases" *International Archives of Allergy and Immunology* 105: 128-134. Citado en Blann y Lip, 1997.
- Tomer A, Masalunga C, Abshire T (1999) "Determination of Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Rapid Flow Cytometric Assay for Direct Demonstration of Antibody-Mediated Platelet Activation". *American Journal of Hematology* 61: 53-61.
- Tsai N, Chang W, Shaw C, Jan C, Chang H, Huang C, Chen S, Chuang Y, Lee L, Wang H, Lee T, Lu C (2009) "Levels and value of platelet activation markers in different subtypes of acute non-cardio-embolic ischemic stroke" *Thrombosis Research*: 1-6.
- Tschoepe D, Driesch E, Schwippert B, Lampeter E (1997) "Activated platelets in subjects at increased risk of IDDM". *Diabetologia* 40: 573-577.
- Ushiyama S, Laue T, Moore K, Erickson H, McEver R (1993) "Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin". *The Journal of Biological Chemistry* 268(20): 15229 –15237.
- van Kooten F, Ciabattoni G, Koudstaal P, Dippel D, Patrono C (1999) "Increased platelet activation in the chronic phase after cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage". *Stroke* 30: 546-549.
- Vega S, Reyes-Maldonado E, Vela-Ojeda J, Xoloti-Castillo M, Montiel-Cervantes L, Cerecedo-Mercado D (2006) "Estudio estructural de las plaquetas de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna" *Revista de Investigación Clínica* 58: 475-486.

Vitale M, Tazzari P, Ricci F, Mazza M, Zauli G, Martini G, Caimi L, Manzoli F, Conte R (2001) "Comparison Between Different Laboratory Tests for the Detection and Prevention of Heparin-Induced Thrombocytopenia". *Cytometry* 46: 290-295.

Volcik K, Ballantyne C, Coresh J, Folsom A, Boerwinkle E (2007) "Specific P-selectin and P-selectin Glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and Ischemic stroke: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) Study". *Atherosclerosis* 195(1): e76-e82.

Voller A, Bartlett A, Bidwell D (1978) "Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques". *Journal of Clinical Pathology* 31(6): 507–520.

Wright J (1906) "The origin and nature of blood platelets" *Boston Medical and Surgical Journal* 154: 643-645. Citado por Gazzaniga, 2001; Caunedo P (2004).

Xu Y, Li J, Fang W, Yu M, Ru B (2008) "A potential thrombus diagnosis reagent based on P-selectin monoclonal antibody SZ-51 light chain". *Thrombosis Research* 123(2): 306-315.

Yip H, Chen S, Liu J, Chang H, Kao Y, Lan M, Chang Y, Lai S, Chen W, Chen M (2004) "Serial changes in platelet activation in patients after ischemic stroke. Role of pharmacodynamic modulation". *Stroke* 35: 1683-1687.

Yip H, Chang L, Sun C, Yang C, Hung W, Hang C, Wu C, Chua S, Yeh K, Chang H (2006) "Platelet activation in patients with chronic nonvalvular atrial fibrillation". *International Heart Journal* 47(3): 371-379.

SPSS 10,0 for windows. Standard version SPSS Inc.

http://www.msp.gub.uy/uc_3791_1.html

<http://origin.softonic.com/>

<http://sigmaplot.com/>

<http://www.cica.es/aliens/epiinfo/>

<http://sergas.es/EPIWB/>

X.- ANEXOS

Tabla A.I.- Promedios de los resultados de 47 muestras obtenidos por citometría de flujo. Las mediciones se obtuvieron por triplicado y se obtuvo su promedio. D.C.: dato clínico de cada paciente. Quad UR: “Quadrant Statistics, Upper Right”, es decir el sector doble positivo para los dot-plots CD61 y CD62p; R2: región demarcada sólo por plaquetas activadas; R3: región demarcada por plaquetas activadas y plaquetas activadas unidas a otras plaquetas y/o otros grupos celulares. La media se obtuvo a partir del histograma (“Histogram Statistics”) construido a partir de la región R2.

Muestra	Sexo	Edad	D.C.	Prom.Q-UR R2	Error estánd.	Prom.Q-UR R3	Error estánd.	Prom. Media
3	M	60	DM C/ISQ	0,82	6,98x10 ⁻²	1,54	7,55x10 ⁻²	3,79
4	M	61	DM C/ISQ	1,26	7,05x10 ⁻²	3,47	2,33x10 ⁻²	4,36
5	M	70	DM C/ISQ	0,68	6,33x10 ⁻²	2,15	4,33x10 ⁻²	3,71
6	F	62	DM C/ISQ	0,63	4,67x10 ⁻²	1,37	8,82x10 ⁻²	3,53
7	M	48	DM S/ISQ	0,68	3,46x10 ⁻²	1,31	5,55x10 ⁻²	3,75
8	M	60	ISQ	0,86	2,20x10 ⁻²	1,62	0,1	3,7
9	M	48	DM C/ISQ	14,82	0,2	16,11	0,35	7,24
10	F	51	CONTROL	0,8	7,05x10 ⁻²	2,04	2,4x10 ⁻²	3,68
11	F	44	CONTROL	0,63	3,18x10 ⁻²	1,3	3,61x10 ⁻²	3,62
12	F	66	ISQ	1,06	7,17x10 ⁻²	1,23	3,18x10 ⁻²	3,82
13	M	67	ISQ	1,23	8,74x10 ⁻²	1,79	6,64x10 ⁻²	3,95
14	F	48	DM S/ISQ	1,23	3,05x10 ⁻²	1,47	5,46x10 ⁻²	3,88
15	M	39	DM S/ISQ	0,87	1,53x10 ⁻²	1,79	4,48x10 ⁻²	3,75
16	F	62	CONTROL	0,94	6,12x10 ⁻²	1,64	8,25x10 ⁻²	3,82
17	M	45	DM S/ISQ	0,81	6,98x10 ⁻²	1,35	5,49x10 ⁻²	3,74
18	F	56	DM S/ISQ	1,06	0,12	1,63	0,12	3,86
19	M	56	CONTROL	1,24	4,67x10 ⁻²	2,06	9,4x10 ⁻²	3,96
20	F	53	CONTROL	0,93	1,45x10 ⁻²	1,27	3,53x10 ⁻²	3,81
21	M	52	ISQ	1,23	7,94x10 ⁻²	2,28	9,39x10 ⁻²	4
22	F	78	ISQ	0,62	0,1	1,54	0,12	3,69
23	M	48	DM S/ISQ	0,52	6,11x10 ⁻²	1,21	0,12	3,62
24	M	61	ISQ	0,85	4,58x10 ⁻²	1,14	4,93x10 ⁻²	3,92
25	M	67	DM C/ISQ	0,53	1,20x10 ⁻²	2	1,2x10 ⁻²	3,71
26	M	64	DM C/ISQ	0,42	3,28x10 ⁻²	1,38	4,41x10 ⁻²	3,56
27	M	54	CONTROL	1,06	9,82x10 ⁻²	2,15	3,79x10 ⁻²	3,98
28	F	51	DM S/ISQ	0,5	8,01x10 ⁻²	1,07	0,13	3,69
29	M	54	CONTROL	0,46	3,53x10 ⁻²	1,68	5,61x10 ⁻²	3,56
30	M	49	CONTROL	0,84	6,89x10 ⁻²	1,54	5,33x10 ⁻²	3,74
31	F	65	DM C/ISQ	0,91	4,36x10 ⁻²	1,54	4,18x10 ⁻²	3,71
32	M	69	DM S/ISQ	0,18	5,77x10 ⁻³	0,74	2,96x10 ⁻²	3,25
33	F	56	ISQ	0,32	3,28x10 ⁻²	0,68	1,2x10 ⁻²	3,29
34	M	57	DM S/ISQ	0,46	2,19x10 ⁻²	0,99	9,69x10 ⁻²	3,49
35	M	64	ISQ	0,52	4,91x10 ⁻²	1,48	6,96x10 ⁻²	3,62

36	F	68	DM C/ISQ	0,51	8,82x10-3	2,72	5,03x10-2	3,61
37	F	61	DM C/ISQ	0,5	5,9x10-2	0,91	4,91x10-2	3,6
38	M	71	CONTROL	0,38	4x10-2	1,48	0,15	3,63
39	F	52	CONTROL	0,37	5,84x10-2	0,87	8,82x10-3	3,48
40	M	60	DM C/ISQ	0,85	8,25x10-2	1,92	1,53x10-2	3,77
41	F	70	ISQ	0,78	8,08x10-2	1,64	0,15	3,82
42	M	62	DM S/ISQ	0,48	1,45x10-2	2,81	0,15	3,55
43	M	70	ISQ	0,56	4,26x10-2	1,19	4,04x10-2	3,69
44	M	70	ISQ	0,41	4,04x10-2	1,12	3x10-2	3,59
45	M	62	CONTROL	0,65	6,67x10-3	1,05	4,91x10-2	3,73
46	F	48	CONTROL	0,75	2,19x10-2	1,37	5,13x10-2	3,69
47	F	62	CONTROL	0,62	3,76x10-2	1,54	7,57x10-2	3,69
48	F	55	CONTROL	0,76	5,86x10-2	2,14	7,13x10-2	3,84
49	M	61	CONTROL	0,45	2,73x10-2	1,87	3,76x10-2	3,44

Tabla A.II.- Medias y errores estándar para las moléculas de CD62p y CD40L obtenidas por ELISA para 57 muestras. D.C.: dato clínico de cada paciente. Las mediciones se obtuvieron por triplicado y se obtuvo su promedio.

MUESTRA	SEXO	EDAD	D.C.	CD62p	ERROR EST.	CD40L	ERROR EST.
				MEDIA(ng/ml)		MEDIA(pg/ml)	
1	M	63	DM C/ISQ	8,27	1,11	100,56	1,96
2	F	62	DM C/ISQ	8,53	0,12	111,04	13,21
3	M	60	DM C/ISQ	8,53	0,65	110,14	1,13
4	M	61	DM C/ISQ	8,16	0,20	104,28	1,39
5	M	70	DM C/ISQ	6,45	1,45	125,04	13,88
6	F	62	DM C/ISQ	8,16	0,35	148,92	40,98
7	M	48	DM S/ISQ	9,17	0,41	94,82	2,70
8	M	60	ISQ	7,31	0,97	98,65	5,05
9	M	48	DM C/ISQ	7,20	0,48	142,35	4,59
10	F	51	CONTROL	10,29	0,14	105,63	4,51
11	F	44	CONTROL	10,51	1,29	96,85	4,23
12	F	66	ISQ	7,68	0,25	148,47	7,59
13	M	67	ISQ	10,19	0,11	108,79	4,18
14	F	48	DM S/ISQ	5,65	0,78	135,11	14,39
15	M	39	DM S/ISQ	10,24	1,92	173,22	2,65
16	F	62	CONTROL	9,58	0,33	141,50	7,73
17	M	45	DM S/ISQ	11,09	0,10	90,10	6,50
18	F	56	DM S/ISQ	6,61	0,25	109,47	8,50
19	M	56	CONTROL	9,17	0,51	167,42	4,97
20	F	53	CONTROL	10,29	0,58	376,75	60,29
21	M	52	ISQ	8,64	0,62	119,51	9,57
22	F	78	ISQ	8,48	0,29	101,69	3,93
23	M	48	DM S/ISQ	5,44	0,87	83,01	4,19

24	M	61	ISQ	11,31	0,81	99,10	3,70
25	M	67	DM C/ISQ	7,95	0,22	90,43	15,82
26	M	64	DM C/ISQ	16,69	1,08	159,50	13,01
27	M	54	CONTROL	10,88	0,78	100,90	6,35
28	F	51	DM S/ISQ	9,12	0,24	100,45	0,46
29	M	54	CONTROL	8,32	0,51	97,41	3,39
30	M	49	CONTROL	9,92	0,65	111,04	6,95
31	F	65	DM C/ISQ	7,43	0,58	236,25	15,00
32	M	69	DM S/ISQ	7,38	0,79	238,75	7,77
33	F	56	ISQ	9,87	0,49	254,75	10,24
34	M	57	DM S/ISQ	7,08	0,50	178,00	5,11
35	M	64	ISQ	6,87	0,56	231,00	20,07
36	F	68	DM C/ISQ	7,33	0,84	292,00	10,10
37	F	61	DM C/ISQ	8,91	1,03	236,00	1,76
38	M	71	CONTROL	9,93	0,70	192,00	3,99
39	F	52	CONTROL	8,51	0,55	167,25	13,94
40	M	60	DM C/ISQ	16,04	1,81	182,75	3,11
41	F	70	ISQ	8,22	0,43	159,75	4,39
42	M	62	DM S/ISQ	11,85	0,77	158,50	4,36
43	M	70	ISQ	10,23	1,22	213,00	4,63
44	M	70	ISQ	13,67	2,75	157,25	3,27
45	M	62	CONTROL	9,90	0,18	164,50	15,46
46	F	48	CONTROL	10,62	0,15	169,00	12,07
47	F	62	CONTROL	12,69	0,62	144,50	8,54
48	F	55	CONTROL	7,04	0,48	173,25	4,14
49	M	61	CONTROL	10,11	1,73	174,25	6,54
50	F	68	ISQ	7,45	0,44	155,00	12,82
51	M	64	DM C/ISQ	9,61	0,00	180,00	3,43
52	M	74	DM C/ISQ	9,99	1,26	176,00	2,07
53	M	61	CONTROL	10,17	0,56	159,00	2,47
54	M	68	DM S/ISQ	19,87	1,05	191,50	3,90
55	M	58	DM C/ISQ	18,53	1,75	145,00	9,96
56	M	53	DM C/ISQ	14,46	0,63	184,00	5,04
57	M	62	CONTROL	11,98	0,42	128,25	9,65