



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Estudio de factores trombofílicos y
hemorreológicos en pacientes con infarto al
miocardio menores de 45 años**

T E S I S

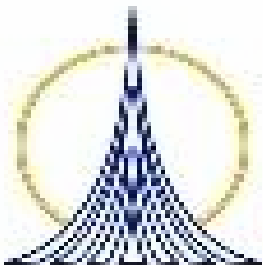
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTADA:

C. CARRERA MARÍN ANA LAURA

DIRECTOR: DR. ADOLFO CHÁVEZ NEGRETE

ASESOR: DR. RUBÉN MARRÓQUIN SEGURA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

❖ *Con cariño y afecto a mis padres Juana y Leonides, por quererme y apoyarme a lo largo de mi vida.*

❖ *A mis hermanos Jorge y Víctor Manuel.*

❖ *A mi Mariana.*

Agradecimientos

- ❖ *Al Dr. Adolfo Chávez Negrete por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y por sus consejos tan atinados.*
- ❖ *A la Q. Magdalena Rojas Uribe por sus enseñanzas y amistad.*
- ❖ *A los miembros del laboratorio de coagulación especial del Hospital de Especialidades del Centro Medico Nacional Siglo XXI, por permitirme realizar mi trabajo experimental y por sus enseñanzas.*
- ❖ *A mis sinodales Dr. Rubén Marroquín Segura, QFB. Rosalba Cervantes Cruz, QFB. Araceli García del Valle, M.C: Maurilio Flores Pimentel, por sus aportaciones, sugerencias y correcciones.*

INDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
4. Planteamiento del problema	12
5. Justificación	13
6. Objetivos	14
7. Hipótesis	15
8. Actividades desarrolladas	16
9. Diseño experimental	17
9.1 Tipo de estudio	17
9.2 Población de estudios	17
9.3 Criterios de inclusión	17
9.4 Criterios de no inclusión	17
9.5 Criterios de exclusión	18
9.6 Variables	18
9.7 Tamaño de la muestra	19
9.8 Procedimientos	19
9.8.1 Viscosidad sanguínea	20
9.8.2 Agregación plaquetaria	22

9.8.3	Determinación de la actividad de la proteína C, proteína S, antitrombina III, resistencia a la proteína C activada, anticoagulante lúpico y fibrinógeno.	26
9.9	Diseño estadístico	38
10.	Resultados	39
11.	Análisis de resultados	49
12.	Conclusiones	53
13.	Anexos	54
	Anexo I. Carta de consentimiento	55
	Anexo II Forma de registro del paciente	56
	Anexo III Forma de resultados de viscosidad sanguínea	57
	Anexo IV Forma de resultados de pruebas de trombofilia	58
	Anexo V Glosario	59
	Anexo VI Determinación de homocisteína en suero y plasma	64
14.	Referencias	69

1. RESUMEN

Introducción: El infarto agudo del miocardio es una de las primeras causas de muerte en los países occidentales y en México. El estudio se orientó a buscar hiperagregación plaquetaria y deficiencia de proteínas anticoagulantes, hiperviscosidad sanguínea en pacientes jóvenes con infarto del miocardio.

Material y Métodos: Las pruebas de laboratorio que se usaron para la medición del fibrinógeno fue el método de Clauss, para antitrombina III (AT-III) se utilizó un método cromogénico, proteína S (PS), proteína C (PC), resistencia a la proteína C activada (RPCA) y presencia de anticoagulante lúpico (AL) por el método coagulométrico y las agregometrias plaquetarias por el método óptico. La viscosidad sanguínea se determinó en un viscosímetro digital Wells-Brookfield.

Se estudiaron 14 pacientes menores de 45 años con infarto agudo del miocardio (grupo de estudio) y se comparó con 5 pacientes con la misma patología pero de diferentes edades mayores de 60 años (grupo de comparación).

Resultados: El 82% de pacientes pertenecen al sexo masculino y 18% al sexo femenino de la población total. De los 15 pacientes del grupo de estudio (\leq de 45 años) 4 presentaron hiperagregación con ADP (difosfato de adenosina), aunque los resultados no son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) con respecto al grupo de comparación (\geq de 60 años), en las dos primeras diluciones. No se encontraron deficiencias de proteínas anticoagulantes (PC, PS, AT-III), ni RPCA o presencia del anticoagulante lúpico, y no existe correlación entre las variables de fibrinógeno y viscosidad sanguínea.

Conclusión: Con el grupo estudiado no se puede obtener un análisis concluyente es necesario continuar con el estudio iniciado para hacer más grande la casuística sobre todo en las determinaciones de la agregación plaquetaria y realizar otros estudios como la determinación de homocisteína como factor de riesgo cardiovascular.

2. INTRODUCCION

La primera causa de muerte en los países desarrollados y en la gran mayoría de los que están en vías de desarrollo, es el infarto al miocardio. El incremento en pacientes jóvenes, ha postulado que factores ambientales y genéticos estén implicados con mayor predisposición para el evento trombótico; como algunas mutaciones genéticas (la mutación G20210A en el gen de la protrombina, mutación G1691A del gen del factor V Leiden), tanto factores precipitantes de aterogénesis como la hiperhomocisteinemia; incremento en la actividad del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) o deficiencia del activador tisular del plasminógeno (t-PA), alteraciones en la agregación plaquetaria, deficiencias de proteínas anticoagulantes (Proteína C, Proteína S, Antitrombina III), resistencia a la proteína C activada directamente relacionada con la mutación del factor V de Leiden y presencia del anticoagulante lúpico.

En nuestra población han sido poco estudiadas los factores trombogénicos que explique el desenlace en un síndrome coronario, particularmente este aspecto es interesante en el paciente joven. Dentro de estos factores la agregación plaquetaria, deficiencia de algunas proteínas anticoagulantes y la viscosidad sanguínea son algunos de los postulados aún no demostrados. El presente proyecto investigo a través de pruebas de agregación plaquetaria, y un perfil de trombofilia, una teoría que fundamente el padecimiento en adultos jóvenes con infarto al miocardio y posiblemente también justifique un tratamiento más congruente.

3. MARCO TEORICO

El infarto agudo del miocardio es una de las primeras causas de muerte en los países occidentales y en México, de acuerdo con el reporte Salud México 2003 las muertes por enfermedad isquémica del corazón pasó de 30 mil en 1990 a casi 50 mil. Se han identificado en forma consistente varios factores de riesgo asociados como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la dislipidemia, la obesidad y el tabaquismo¹.

La placa aterosclerosa el evento desencadenante del infarto, es el fenómeno común de los factores de riesgo mencionados, que con los años termina por ocluir las arterias; es un proceso crónico en el que participan además plaquetas y factores de coagulación², es por ello que la enfermedad vascular aterosclerosa había sido una enfermedad del adulto mayor; no obstante, en los últimos años el infarto de miocardio (IM) ha sido cada vez más frecuente en individuos jóvenes, lo que pone en duda a la aterosclerosis como único participante en la enfermedad vascular oclusiva.

Por otro lado, a pesar de que la aterosclerosis coronaria es la causa del infarto en la mayoría de los individuos, existen un pequeño pero significativo grupo de pacientes que presentan infarto en ausencia de placa, como se ha demostrado en algunos de los angiogramas coronarios^{3, 4}. Al ser desconocida la fisiopatogenia del infarto en estos casos, se le ha denominado síndrome X o angina microvascular; diversas hipótesis han surgido alrededor de este hallazgo, como los fenómenos embólicos o microtrombóticos, trastornos vasomotores y del sistema fibrinolítico, sin embargo hasta la fecha ninguno de ellos ha sido contundentemente demostrado⁵.

El infarto de miocardio suele producirse cuando el flujo coronario disminuye bruscamente a causa de la oclusión de una arteria coronaria comprometida por aterosclerosis. El crecimiento lento y progresivo de la placa va obstruyendo la luz intra-arterial, lo que impide el paso de la sangre creando turbulencias. De forma aguda, la obstrucción total puede deberse a la formación de un trombo en la superficie irregular de la placa fracturada o a la hemorragia en su interior⁶. Este

proceso fisiopatogénico se ha estudiado en personas mayores, sin embargo en pacientes jóvenes que han sufrido infarto, se presenta otro escenario; por un lado la presencia “precoz” de una placa ateromatosa es inusual, particularmente si el sujeto carece de los factores de riesgo reconocidos y por otro lado, si alguno de los factores existiera, son pocos los años para desarrollar una placa de colesterol, por lo que uno esperaría un factor extra desencadenante de aterosclerosis.

Los estrechamientos de la luz de las arterias coronarias se forman a través del proceso de aterogénesis; este consiste en el depósito de macrófagos, de tejido conectivo y de lípidos, tanto intracelulares como extracelulares compuestos por colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. Este depósito se conglomeran excéntricamente formando la placa de ateroma que con elevada frecuencia se calcifica o presenta hemorragia de los pequeños vasos que surgen dentro de la lesión. Este proceso lleva años y por lo general se presenta en edades avanzadas. La hipercolesterolemia es la alteración que con mayor consistencia se ha asociado a aterosclerosis, pero no es la única⁷.

Estudios realizados en los ochentas, han relacionado los niveles elevados de fibrinógeno con enfermedad cardiovascular y el tabaquismo⁸⁻⁹. En un escrutinio realizado en 3,403 pacientes con angina, se encontró elevación de fibrinógeno principalmente en aquellos sujetos con uno o más vasos estenosados por arriba del 50%, mientras que cifras normales se relacionaron con vasos coronarios limpios¹⁰. Aunque el fibrinógeno es un reactante de fase aguda, y su elevación podría haber sido una consecuencia del evento inflamatorio – isquémico, otros estudios han demostrado lo contrario. Un mecanismo que puede explicar la acción causal del fibrinógeno en la producción de angina, se basa en que esta proteína actúa como un cofactor hemostático y hemorreológico, en la agregación plaquetaria e interacción endotelial¹¹, es por ello que ha sido considerado en la última década como un factor de riesgo coronario¹².

El fibrinógeno es una proteína de elevado peso molecular (340,000 daltons) sintetizado predominantemente en el hígado; está constituido por tres diferentes tipos de cadenas polipeptídicas y sus niveles oscilan entre 200 y 400 mg/dL con una vida media de entre 3 a 6 días¹³. Se le ha considerado una proteína de fase

aguda, un factor de la coagulación y un cofactor de agregación plaquetaria; también participa en la estimulación, migración y proliferación de las células del músculo liso¹⁴. El fibrinógeno por su tamaño, es el elemento con mayor participación en la viscosidad plasmática¹⁵ y por esta razón ha sido implicado en eventos hemorreológico - trombóticos¹⁶⁻¹⁹, por lo que algunos autores han considerado que encontrándose en cifras superiores es un factor de riesgo vascular, como lo es el tabaquismo, la hipertensión o la diabetes²⁰.

El fibrinógeno es un elemento que por su peso, está implicado en la viscosidad sanguínea. La viscosidad sanguínea (η), es una de las variables más importantes de la hemorreología; puede definirse como la relación que existe entre el esfuerzo de deslizamiento de las diferentes capas de la sangre (shear stress) a través del vaso y la velocidad de las partículas (shear rate)²¹, y se expresa con la siguiente fórmula:

$$\eta \text{ (mPa.s)} = \frac{\text{shear stress (mPa)}}{\text{shear rate (s}^{-1}\text{)}}$$

Hagen-Poiseuille demostró que existe una relación inversa entre la η y la velocidad de flujo a lo largo de un tubo expresado en la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de flujo} = \frac{\text{Gradiente de presión} \times \text{Radio del vaso}^4}{\text{Longitud del vaso} \times \eta}$$

Por lo tanto, la velocidad del flujo depende de la presión y de la resistencia al mismo flujo (longitud / radio⁴). El flujo sanguíneo se encuentra bajo diferentes gradientes de presión, desde una elevada presión a través de la aorta hasta la microcirculación donde se encuentra a muy baja presión, particularmente en el sistema venoso.

La viscosidad del agua y del plasma son casi similares; sin embargo, el plasma debido a la presencia de proteínas como el fibrinógeno, tiene una viscosidad discretamente superior a la del agua (1.15 a 1.35 mPa.s a 37°C); en cambio la

viscosidad de la sangre depende casi exclusivamente de la cantidad de glóbulos rojos; esta suele ser de 3.5 a 5.5 mPa.s a 37°C cuando el hematocrito varía de 37 a 51% respectivamente.

El impacto clínico de la viscosidad sanguínea ha sido demostrado por diferentes autores y su incremento es motivo de tratamiento con diversos esquemas de manejo, uno de ellos a través de la hemodilución, como en los casos de eritrocitosis secundarias a neumopatías crónicas²², o en las paraproteinemias como la de Waldstrom.

La viscosidad sanguínea depende de la velocidad de deslizamiento a través del bazo; a un elevado deslizamiento la viscosidad será menor debido a que los glóbulos rojos al deformarse más rápidamente en elipses, ejercen menor esfuerzo viajando en forma paralela a la dirección del flujo, mientras que a bajas velocidades, los glóbulos tienden a agregarse elevando la viscosidad por el esfuerzo de deslizamiento²³.

El fibrinógeno al ser la molécula más pesada del plasma, modifica no solamente la viscosidad plasmática sino también la sanguínea total, ya que el fibrinógeno sirve de puente de unión entre las plaquetas a través de receptores específicos denominados glicoproteínas IIb-IIIa lo que incrementa el esfuerzo de deslizamiento de la sangre; de ahí que haya sido considerado un factor de riesgo vascular²¹.

Otras proteínas de la sangre como las lipoproteínas pueden tener influencia sobre la viscosidad plasmática particularmente cuando se encuentran en cifras elevadas, repercutiendo sobre la viscosidad sanguínea total; el proyecto MONICA²⁴ ha demostrado correlación entre los niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el incremento en la viscosidad plasmática. Aunque en el plasma están contenidas otras proteínas como la albúmina, α_2 macroglobulina y las gamaglobulinas éstas solamente tiene impacto sobre la viscosidad plasmática cuando rebasan en número y/o tamaño a las normales, como sucede en las gamopatías monoclonales que cursan con el conocido síndrome de hiperviscosidad²⁵.

El incremento en la viscosidad sanguínea como consecuencia de la hiperfibrinogenemia ha sido explorado en la angina microvascular²⁶, hipotéticamente puede condicionar disminución del flujo vascular como ha sido descrito por algunos autores en el síndrome X²⁷. En un estudio piloto aún no publicado por nosotros encontramos efectivamente incremento en la viscosidad sanguínea en pacientes con síndrome X, pero no de fibrinógeno, lo que hace pensar que hay otros factores hemorreológicos involucrados.

Por otro lado, recientes estudios han enfocado la atención entre niveles elevados de fibrinógeno y la presencia del polimorfismo del gen de la cadena β del fibrinógeno (Bcll β Fb) en pacientes que sufrieron infarto al miocardio antes de los 40 años²⁸.

Otros estudios han demostrado algunos “defectos” de la función plaquetaria como posibles inductores de fenómenos de hipercoagulabilidad; en 1983 los doctores Holliday y Mammen presentaron su experiencia en la *Novena Conferencia Internacional sobre Trombosis y Circulación Cerebral* en Phoenix, Arizona donde describieron un síndrome relacionado con infarto cerebral en adultos jóvenes denominándolo “Síndrome de la Plaqueta Pegajosa” (*Sticky Platelet Syndrome*)²⁹.

Este síndrome de reciente identificación, supone trastornos en la agregabilidad de las plaquetas manifestado por incremento anormal de la misma y en consecuencia tendencia a la ocurrencia de fenómenos vasooclusivos tanto arteriales como venosos³⁰⁻³¹. Se han identificado tres formas de este síndrome: El tipo I caracterizado por hiperagregación plaquetaria facilitada con difosfato de adenosina (ADP) y epinefrina, el tipo II presente solo con epinefrina, y el tipo III solo con ADP³¹⁻³².

En 1986 Mammen y colaboradores, presentaron un estudio realizado en 41 pacientes adultos con dolor precordial y arterias coronarias angiográficamente normales, con hiperagregabilidad plaquetaria tipo I y II³³.

La agregación plaquetaria puede ser inducida por agonistas como el ADP, epinefrina y ácido araquidónico; todos los agonistas son activados por una vía común que se relaciona con la elevación de la concentración citoplasmática de calcio. Las enzimas de membrana como la fosfolipasa C, fosfolipasa A₂ y adenilciclase causan un movimiento hacia el citoplasma de los iones de calcio a partir del sistema tubular denso; si la concentración de calcio en las plaquetas es pobre en el citoplasma, se activan los sistemas intracelulares; con la activación se expone sus ligandos GP IIb/IIIa, y receptores del factor de Von Willebrand, los cuales requieren de calcio activo para su enlace y formar puentes interplaquetarios. El aumento de calcio citoplasmático hace que las plaquetas liberen al exterior su propio ADP a partir de los cuerpos densos, estimulando más receptores de plaquetas.

Otros estudios han investigado el papel de alteraciones en genes relacionados con la hemostasia en pacientes jóvenes con infarto; en el caso de la glicoproteínas de membrana plaquetaria, está implicado el polimorfismo GP IIb/IIIa P1 (A1)/P1 (A2) en pacientes homocigotos, además afines con enfermedad cardiovascular isquémica, sin embargo una asociación con heterocigotos es aun polémica³⁴.

Se ha sugerido que la tendencia trombótica aumenta el riesgo de infarto al miocardio a una edad joven, como los desordenes genéticos (la mutación G20210A en el gen de la protrombina, mutación G1691A del gen del factor V Leiden) y deficiencias de la proteína C, proteína S y antitrombina III. Un estudio dirigido entre 70 sobrevivientes de infarto al miocardio que había experimentado el evento antes de la edad de 36 años se encontró más a menudo la mutación de G20210A en el gen de la protrombina con respecto al grupo control (11.4 contra 3.1%)³⁵.

La proteína C es una glicoproteína plasmática de 62Kd, de síntesis hepática dependiente de la vitamina K. Es la precursora de la proteína C activada. La activación de la proteína C se produce tras la unión de la trombina a la trombomodulina. Así la trombina, pierde su efecto procoagulante y constituye el paso inicial de activación de la vía de la proteína C activada. La proteína C activada es responsable de la inactivación de los factores Va y VIIIa; para ello

requiere la unión a la proteína S. Esta reacción se produce en la superficie de las plaquetas y en el endotelio³⁶.

El factor V es una glicoproteína plasmática de 300,000 Kd, de síntesis hepática; se activa por la trombina y es el cofactor del factor Xa en el complejo protrombinasa (Xa-Va). La proteína C activada inactiva el FVa en las argininas 506, 306, y 679.

En 1994, se descubrió que la mutación puntual en 1,691G→A, produce una variante del factor V, donde la arginina 506 está sustituida por una glutamina. Esto hace que sea más resistente a la degradación por la proteína C activada. Esta mutación es responsable del hallazgo plasmático de resistencia a la proteína C activada³⁷. La resistencia a la proteína C activada puede observarse en pacientes sin la mutación factor V Leiden, pero con valores elevados del factor VIII, con anticoagulante lúpico o en mujeres embarazadas.

La antitrombina III (AT III) evita la formación de fibrina a partir de fibrinógeno, inhibe la activación del factor VIII y V a partir de la trombina, ya que esta pierde su capacidad enzimática al unirse con la AT III, esta glucoproteína se produce en las células endoteliales.

Se han identificado que ciertas alteraciones del sistema fibrinolítico, son un factor de susceptibilidad para el infarto al miocardio en edad temprana. Un estudio realizado en 1985 en post-infartados menores de 45 años se encontró aumentado un inhibidor rápido (PAI-1) del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y la importancia que puede tener en la patogénesis del infarto al miocardio particularmente en pacientes con hipertrigliceridemia³⁸. EL rol patogénico del PAI-1 en enfermedad arterial coronaria se ha confirmado recientemente, reportándose una relación entre concentraciones del PAI-1 y enfermedades coronarias³⁹.

El sistema fibrinolítico tiene como objetivo la lisis de la fibrina depositada en el árbol vascular, es decir, es un sistema reactivo al despertar de la coagulación y a la generación final de trombina. La plasmina, una serín-proteasa de 85Kd, es la enzima central de este sistema. En condiciones normales circula por el plasma

humano en forma de proenzima, el plasminógeno. La transformación del plasminógeno en plasma la llevan a cabo los denominados activadores del plasminógeno: activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador tipo urocinasa (t-UK): La plasmina es una enzima extraordinariamente inespecífica capaz de degradar a la fibrina, al fibrinógeno, a los factores de coagulación V y VIII y a otros muchos sustratos. Para regular esta actividad proteolítica de la plasmina, el plasma humano posee un inhibidor muy selectivo y potente llamado α_2 -antiplasmina. Asimismo, para regular a los activadores del plasminógeno el sistema está dotado de los llamados inhibidores de la activación del plasminógeno tipo I (PAI-1), tipo II (PAI-2) y tipo III (PAI-3). EL PAI-1 es una glucoproteína, de 52,000 daltons, compuesta por 379-381 aminoácidos y el gen que sintetiza para dicha proteína se halla situado en el cromosoma 7, es un inhibidor de serín-proteasas y como tal tiene la estructura típica de serina, arginina y aspártico en el centro activo.

Existen otros factores implicados con la presencia precoz de aterosclerosis. La hiperhomocisteinemia se ha relacionado como un nuevo factor de riesgo para enfermedad cardiovascular incluido el infarto de miocardio cuando sus niveles se encuentran elevados. Esta asociación ha sido consistente en estudios prospectivos que incluían sujetos de mediana edad⁴⁰, incluso desde hace años se conoce que los pacientes homocigotos a una rara enfermedad llamada homocistinuria desarrollan la patología cardiovascular a temprana edad (entre 20 y 30 años). Este mismo aumento de la tendencia se había observado en pacientes con deficiencias individuales o combinadas de ácido fólico, vitamina B6, y vitamina B12, ya sea generada por disminución de la ingesta o por interacción de medicamentos que interfieren con el metabolismo o la absorción de dichas vitaminas.

La actividad disminuida de la 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) una enzima reguladora del metabolismo de la homocisteína, puede predisponer a enfermedad coronaria. En un estudio se determinó el predominio de dos polimorfismos (C677T y A1298C) de (MTHFR), en 161 pacientes con enfermedad vascular coronaria menores de 50 años, el alelo 1298C mostró una asociación significativa con enfermedad vascular en edad temprana en homocigotos y en los

portadores del heterocigotos incluso cuando los niveles del homocisteína en sangre no son elevados⁴¹.

Otro estudio demostró que en pacientes con infarto de miocardio existe una correlación positiva entre la homocisteína total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) estos resultados hacen pensar en una relación entre LDL y la homocisteína como marcadores pronóstico en los pacientes de infarto de miocardio⁴².

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de los posibles mecanismos fisiopatogénicos del IM pueden encontrarse alteraciones en los sistemas hemostáticos hemorreológicos mas allá de lo que los estudios rutinarios pueden demostrar particularmente en personas jóvenes.

La hiperfibrinogenemia en algunos sujetos con IM sustentaría la hipótesis de la presencia de un factor hemostático- hemorreológico como responsable del trastorno vascular, con incremento de la viscosidad sanguínea y agregación plaquetaria.

El fibrinógeno es el principal determinante de la viscosidad plasmática limitando el flujo sanguíneo reduciendo el aporte de oxígeno, predisponiendo a trombosis o potencializando la aterogénesis.

Por otro lado han sido poco estudiados los trastornos trombóticos predisponentes del infarto en personas jóvenes, debido principalmente a que durante el período agudo estos trastornos se ven modificados por la terapia de rescate fibrinolítica y antiagregantes plaquetarios.

El estudio piloto que se propone en algunos de los pacientes a los que se les pueda analizar podría dar pie a un proyecto de mayor dimensión, pretendiendo solamente apoyar la hipótesis de que los sujetos jóvenes pueden cursar con trastornos de agregación plaquetaria, factores trombofílicos y hemorreológicos predisponentes para la presencia de IM.

De demostrarse alguna de las variantes sospechadas, habría sustento para indicar un manejo más racional y precoz.

5. JUSTIFICACIÓN

El incremento en la frecuencia del infarto de miocardio en adultos jóvenes, ha postulado que los factores ambientales y genéticos estén participando con mayor predisposición para la presencia del evento trombótico; tanto factores precipitantes de aterogénesis como las dislipidemias familiares como la hiperhomocisteinemia como factores pretrombóticos como el incremento en el PAI-1 y agregación plaquetaria han sido demostrado recientemente en pacientes adultos con IM, sin embargo esta asociación no ha sido demostrada en individuos jóvenes donde los factores aterogénicos no han tenido el tiempo "suficiente" para establecer la aterosclerosis coronaria; esta pregunta por lo tanto genera la hipótesis de que otros factores trombofílicos están interviniendo en una placa incipiente o en un endotelio precondicionado para precipitar la oclusión vascular.

Dentro de estos factores la agregación plaquetaria y la viscosidad sanguínea son algunos de los postulados aún no demostrados.

El presente estudio pretende demostrar que algunos de los factores trombofílicos se encuentran alterados en individuos jóvenes al compararlos con los pacientes mayores que cursaron con IM.

6. OBJETIVOS

Se realizaron los siguientes objetivos:

1. Demostrar alteración en la agregación plaquetaria en los pacientes menores de 45 años con IM, al compararlos con pacientes mayores de 60 años con IM.
2. Demostrar la deficiencia de proteínas anticoagulantes (proteína C, proteína S, antitrombina III), resistencia a la proteína C activada, presencia de anticoagulante lúpico en pacientes menores de 45 años con IM, al compararlos con pacientes mayores de 60 años con IM.
3. Demostrar que los pacientes menores de 45 años con IM tienen cifras de fibrinógeno por arriba del 4° quintil y viscosidad sanguínea elevada, al compararlos con pacientes mayores de 60 años con IM.

7. HIPOTESIS

H₁. Existirá alteración en la agregación plaquetaria en los pacientes menores de 45 años con IM, al compararlos con pacientes mayores de 60 años con IM.

H₂ Existirá deficiencia en algunos de los niveles de las proteínas anticoagulantes (proteína C, proteína S, antitrombina III), resistencia a la proteína C activada o presencia de anticoagulante lúpico en pacientes menores de 45 años con IM, al compararlos con pacientes mayores de 60 años con IM.

H₃. Los pacientes menores de 45 años con IM tienen cifras de fibrinógeno por arriba del 4° quintil y viscosidad sanguínea elevada, al compararlos con pacientes mayores de 60 años con IM.

9. DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1 Tipo de estudio

Prospectivo, comparativo y descriptivo.

9.2 Población de estudio.

Se incluyo a pacientes mayores de 18 y menores de 45 años con el diagnóstico de IM que aceptaron participar en el proyecto firmando su carta de consentimiento. Que ingresaron a la Unidad de Cuidados Coronarios del Hospital de Cardiología del Centro Medico Nacional Siglo XXI durante el año 2003. Las pruebas se realizaron a continuación de 3 meses del infarto.

9.3 Criterios de inclusión

9.3.1.- Elevación de CPK y alteraciones electrocardiográficas compatibles con IM:

1. Elevación del segmento ST de ± 1 mm en por lo menos tres derivaciones.
2. Puede o no cursar con onda Q.
3. T con características isquémicas en 2 o más derivaciones

9.3.2.- Hospitalizado en la Unidad Coronaria para su estudio

9.3.3.- Que tengan coronariografía con o sin placa aterosclerosa

9.4- Criterios de no inclusión:

9.4.1 Diabetes Mellitus

9.4.2 Uso de los siguientes medicamentos:

Ticlopidina

Ac. Acetilsalicílico

Pentoxifilina

Acenocumarina o warfarina

9.4.3 Hepatopatía (TGO /TGP elevados dos veces su valor de referencia)

9.4.4 Insuficiencia renal (Creatinina > 1.9 o depuración de ≤ 50 mL/min.)

9.4.5 Hiperglobulinemia (gammaglobulinas > 5 g/dL)

9.5 Serán excluidos:

Aquellos que durante el muestreo sanguíneo se detecte inesperadamente:

5.1.1.- Hiperglucemia

5.1.2.- Decida retirarse del estudio

9.6- Variables

9.6.1. Variable independiente.

Infarto al miocardio

Sexo

Edad

9.6.2. Variable dependiente

Viscosidad sanguínea

Fibrinógeno

Proteína S, Proteína C, Antitrombina III, Resistencia a la proteína

C activada .

Anticoagulante Lúpico.

Operacionalización de las variables dependientes

1. Viscosidad sanguínea.- Variable cuantitativa, evaluada en centipoises (cP)
2. Fibrinógeno.- Variable cuantitativa evaluada en mg/dL
3. Proteínas de coagulación: Antitrombina III, Proteína C, Proteína S, variables cuantitativas evaluada en porcentajes y Resistencia a la proteína C, anticoagulante lúpico variables cuantitativas evaluadas como negativo o positivos.
4. Agregación Plaquetaria.- Variable cuantitativa, evaluada en %.

9.7 Tamaño de la muestra

Dado que se trato de un estudio descriptivo y exploratorio se considero una muestra piloto de 15 pacientes con los criterios diagnósticos señalados y se comparo con 5 sujetos con IM mayores de 60 años.

9.8 Procedimiento

Se registro a partir de la libreta de ingresos de la Unidad de Cuidados Intensivos Coronarios, a todos los pacientes que ingresaron entre Enero del 2003 y Febrero del 2004 y se dividieron en dos grupos:

Grupo I aquellos sujetos menores de 45 años que siendo del valle de México cuenten con expediente clínico en el archivo del Hospital y sean localizables por teléfono.

Grupo II, aquellos individuos mayores de 60 años que siendo del valle de México cuenten con expediente clínico en el archivo del Hospital y teléfono.

Una vez contactado al paciente se les solicito que acudieran a la Consulta Externa de Investigación Clínica para explicarle el proyecto y en su caso recibir su consentimiento. En caso de aceptar se le solicito que acudieran bajo un calendario de citas al Laboratorio de Hemorreología, localizado en la Unidad de Investigación del propio Hospital para toma de muestra sanguínea previa suspensión de anticoagulante y/o anti-agregante 8 días previos, mediante el siguiente esquema:







MUESTRA

- a) 5 ml de sangre total con EDTA
- b) 25 ml de sangre total con citrato de sodio al 3.8%.

ESTUDIO

Viscosidad sanguínea
Agregación plaquetaria, Proteína C, Proteína S. Antitrombina III, Resistencia a la proteína C activada, Anticoagulante Lúpico, Fibrinógeno.

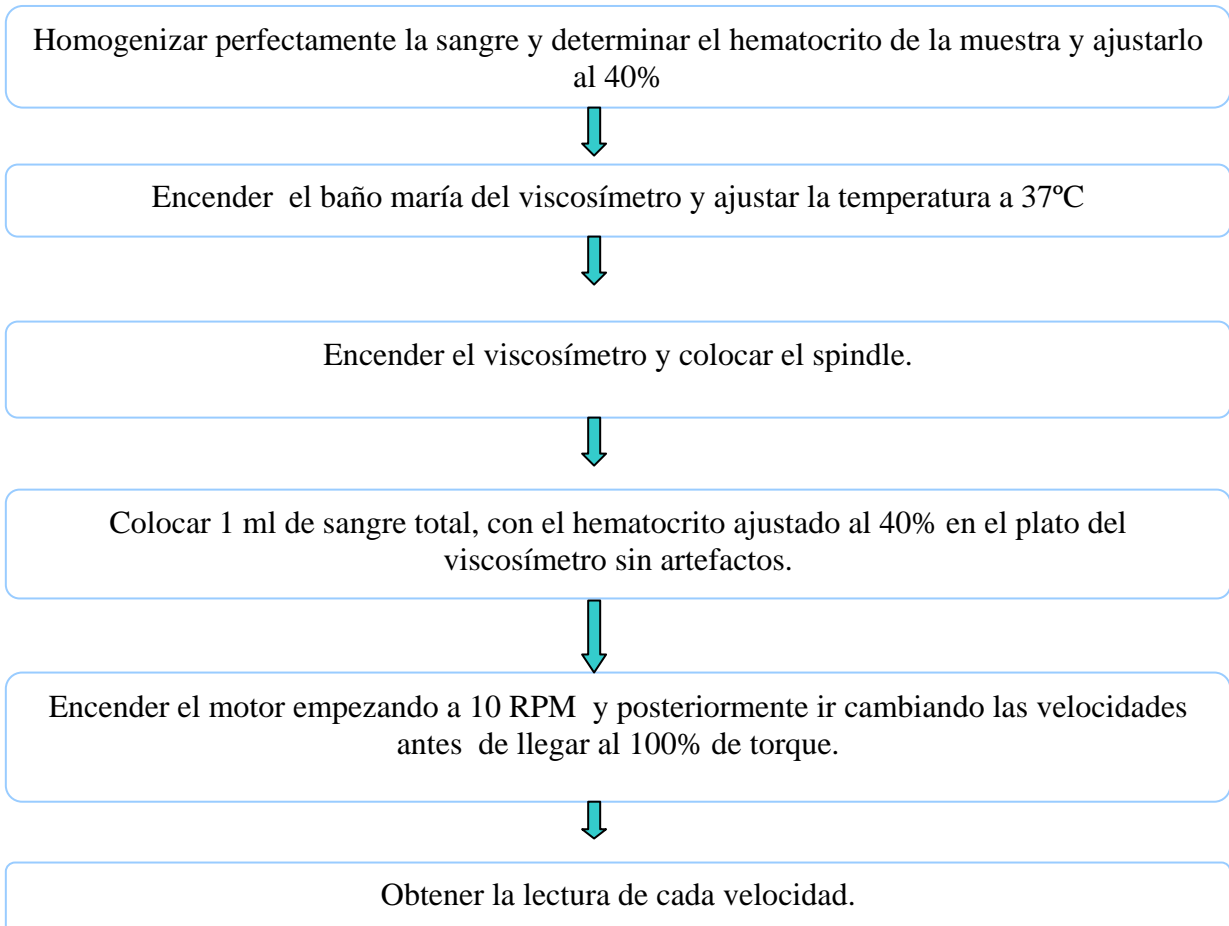
9.8.1 Viscosidad Sanguínea

Material	Equipo
 Tubos VACUTAINER* con EDTA	 Viscosímetro digital Wells-Brookfield (DV-II+Pro), con baño maria integrado
 Tubos FALCÓN*	
 Pipetas automáticas FINNPIPETTE*.	
 Capilares	
 Microcentrífuga ADAMS.	

Obtención de la muestra

La muestra se obtuvo en tubos VACUTAINER* con EDTA

Procedimiento: La viscosidad sanguínea se procesó a través del viscosímetro digital de Wells- Brookfield



El Viscosímetro digital despliega los valores de manera continua de shear stress, shear rate y % de torque; así como la temperatura con la que se esta trabajando.

$$\eta = \frac{\text{Fuerza de deslizamiento (Shear stress)}}{\text{Velocidad de deslizamiento (Shear rate)}}$$

9.8.2 Agregación Plaquetaria

Material

- Cubetas de vidrio siliconadas
- Barritas agitadoras
- Pipetas automáticas FINNPIPETTE*
- Tubos VACUTAINER* citrato al 3.8 %.
- Tubos FALCON*.
- Centrífuga BRINKMANN.
- Agregometro óptico Crhonolog.

Reactivos

ADP (Sigma, catálogo No 885-3) se reconstituyo con 1mL de agua destilada o desionizada dejándolo reposar 15 minutos.

Epinefrina (Sigma, catálogo No885-5) se reconstituyo con 1 mL de agua destilada o desionizada dejándola reposar durante 15 minutos protegiéndola de la luz.

Diluciones de los reactivos

ADP:

El reactivo de ADP reconstituido tiene una concentración de 85.4µg/mL por lo tanto para tener una concentración de 20 µg/mL en 2mL de solución, se hizo una mezcla de 0.478 mL de solución madre más 1.532 mL de agua desionizada (solución 1).

Se tomaron 50µL de la solución No.1 (20 µg /mL) con la cual tenemos 1 µg de ADP/50µL lo necesario para realizar la primera inducción. De esta solución se hizo una dilución 1:2 tomando 1 mL y mezclándolo con 1 mL de agua desionizada (solución 2), de esta mezcla se tomaron 50µ L con una concentración de 0.5 µg de ADP/50µL. De la ultima solución se hizo una nueva dilución 1:2 y finalmente al tomar 50 µL hay una concentración de 0.25 µg de ADP/50µL.

Epinefrina:

El reactivo de epinefrina reconstituido tiene una concentración de 100 μmol , la inducción con epinefrina se realizo con 10 μmol , 1 μmol , 0.5 μmol . Para obtener estas concentraciones se tomo 100 μL de solución madre (reactivo reconstituido con 1 mL de agua desionizada) (solución 1) y 900 μL de agua desionizada de esta manera obtuvimos la concentración 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$, de esta al tomar 100 μL y mezclar con 900 μL de agua desionizada (solución 2), obtenemos la concentración de 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$; finalmente de esta solución tomar 350 μL de agua desionizada para obtener la concentración de 0.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$. De cada una de las concentraciones anteriores se utilizaron 50 μL para la inducción de la agregación plaquetaria.

Toma de muestra

Para el estudio de agregación plaquetaria es fundamental que el paciente no tome medicamentos que contengan ácido acetilsalicílico desde 8 días previos al estudio, además debe presentarse con un ayuno de más de 8h. Se tomaron 8 tubos VACUTAINER* con citrato sódico al 3.8 %, en proporción 1/10. Para el control de la agregación plaquetaria se utilizo un testigo (pool 10 donadores).La muestra de los pacientes (grupo de estudio y control) y el pool se trataron con las mismas condiciones y procedimientos. Asimismo cada paciente, una vez constatada alguna anomalía, fue estudiado, por lo menos una vez más en días diferentes.

Tiempo del ensayo de la agregación

Debido a que las plaquetas necesitan ser metabólicamente activas, la agregación se realizo dentro de las 4 h desde la extracción de sangre.

Procedimiento

Se centrifugo la muestra a 1000 rpm durante 10' a una temperatura de 21-22°C, para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP)



Se separo el PRP con una pipeta automática y se coloco en un tubo de plástico con tapón.



El remanente de sangre se centrifugo a 3500 rpm a una temperatura de 4° C por 15 min. Para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP)



Separar El PPP se separo con una pipeta automática y se coloco en un tubo de plástico con tapón.



El recuento de plaquetas en PRP se determino y ajusto el mismo a 20,0000/mm³, con el PPP para obtener 5mL de PRP ajustado



Con la pipeta de glóbulos rojos se tomo el PRP hasta la marca de 0.5 y se termino de aspirar con oxalato de amonio hasta la marca de 101. Así se obtuvo una dilución 1:200



El número de plaquetas contadas en 5 cuadros terciarios se multiplico por 10,000. El conteo se realizo con el objetivo de 40X



El ajuste se realizó con PPP con la siguiente fórmula:

$$\frac{200,000/\text{mm}^3}{\text{N}^\circ\text{de plaquetas}/\text{mm}^3} \times \frac{5\text{mL}}{1} = \text{mL PRP}$$

Plasma ajustado = mL PRP + mL PPP



En el siguiente orden se encendió el Agregómetro, la interfase, el CPU y el monitor, y se espero a que el Agregómetro llegara a 37° C y regular la velocidad de agitación a 1000rpm.



Se colocó 450 μ L de PRP ajustado en tantas cubetas como pruebas se realizaron, conteniendo una barrita de agitación.



En una cubeta se colocó 500 μ L de PPP el cual sirvió como blanco. En el canal 1 se colocó el PRP y PPP del paciente, y en el canal 2 se colocó el PRP y PPP del pool.







Al iniciar el ensayo se dio línea basal y automáticamente se ajustó la densidad óptica a 0% para PRP y 100% para PPP; durante un minuto se observó, si se presentaba agregación espontánea, a continuación se agregó 50 μ L del agonista. Se observó durante 7 min. la curva de agregación



Los agonistas se adicionaron en el siguiente orden, primero las soluciones madres y después las diluciones comenzando desde la más concentrada hasta la más diluida.

9.8.3 Determinación de la Actividad de la Proteína C, Proteína S, Antitrombina III, Resistencia a la Proteína C activada, Anticoagulante Lúpico y Fibrinógeno

Material	Equipo
 Tubos VACUTAINER* con de sodio al 3.8 %.	 Coagulómetro STAGO-Roche. Modelo STA.
 Tubos EPPENDORF*.	
 Pipetas automáticas FINNPIPETTE*.	

Obtención, preparación y estabilidad de la muestra.

Para estas pruebas se requirió plasma citratado, recogidos en tubos VACUTAINER*. Se utilizaron el plasma pobre en plaquetas obtenido en la prueba de agregación plaquetaria el cual se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL estas se mantuvieron en congelación a -70°C hasta su procesamiento. Las muestras se descongelaron a 37°C entre 5 y 10 minutos y se procesó inmediatamente. Asegurando que la pérdida de actividad de los factores hábiles de coagulación sea despreciable y haya ausencia de crío precipitado.

Determinación de la actividad de la Proteína C

La muestra prediluida se mezcla con cefalina (fosfolípidos equivalentes de FP3), plasma deficiente de proteína C y un activador específico de proteína C, activándose la proteína C contenida en la muestra e iniciándose simultáneamente la activación de contacto de la coagulación. Por la adición de CaCl_2 , se inicia la cascada subsecuente de la coagulación hasta la formación de fibrina. El tiempo parcial de tromboplastina TTP, transcurrido bajo estas condiciones se determina únicamente mediante la actividad de la proteína C de la muestra, ya que después de añadir el plasma deficiente, la mezcla de reacción contiene todos los otros

factores en exceso. La proteína C activada desdobra los factores Va y VIIIa prolongando el TTP, la actividad de la proteína C es proporcional a la prolongación del TTP.

Reactivos

STA Protein C Clotting Cat. No. 1447084 contiene R1 y R2

1. R1 Plasma humano deficiente de proteína C. Reconstituir con 1 mL de agua destilada una vez reconstituido es estable 8 horas a 20° C
2. R2 activador de proteína C. Reconstituir con 1 mL de agua destilada una vez reconstituido es estable 8 horas a 20°C.
3. STA Diluent Buffer Cat No.3138089
4. STA Calcium chloride (0.025 mol/l) Cat. No3138089
5. STA Unicalibrator Cat No.1776584
6. STA Preciclot Plus I Cat. No1776886
7. STA Preciclot plus II Cat. No1776894

Procedimiento

La prueba se realizó en equipo automatizado coagulómetro STAGO- Roche, que realizara el siguiente procedimiento. La muestra del paciente y los controles se emplean sin diluir. El analizador STA diluye automáticamente las muestras y los controles.

Diluir la muestra del paciente, controles y pool 1:10 con Amortiguador de Owren Koller



Adicionar 50 µl del plasma diluido (paciente, controles y pool), 50µl de R1 (plasma deficiente en proteína C) y R2 (activador de proteína C) e incubar a 37 °C durante 3 min.



Adicionar 50µl de cloruro de calcio, registrar el tiempo de formación del coágulo



Se realizará una curva de referencia con un calibrador de referencia STA Unicalibrator



Se realizaran diluciones del calibrador con buffer Owren Koller para obtener concentraciones a 100%, 50%, 25% y 12.5%



Medir la actividad de la proteína C como se menciono anteriormente



Graficar los resultados obtenidos en segundos (ordenada) contra porcentaje de valor normal (abscisa)

Valor de referencia: Entre el 65y 140%

Determinación modificada para la resistencia a la proteína C activada.

La resistencia a la proteína C activada (PCA) se determino midiendo la prolongación de TTPa en plasma en respuesta a la PCA. El TTPa del paciente se determina en presencia y ausencia de PCA diluyendo la muestra 1:5 con plasma deficiente en factor V. EL resultado se expresa como el cociente entre los dos tiempos de coagulación.

Reactivos

(COATEST APC resistance V-S Art. No.82 31 38) de CHROMOGENIX

V-Def Plasma.

Plasma humano estabilizado y liofilizado, con un bajo nivel de actividad en factor V, conteniendo el antagonista de la heparina polibrene. Estabilidad después de la reconstitución 8 horas de 15-25 °C, 24 horas de 2-8°C o 3 meses a -20°C o temperatura inferior en el vial original

CaCl₂.

Cloruro de calcio, 0.025 mol/L, en tampón Tris conteniendo 0.5% de albúmina bovina. Estabilidad una vez abierto: 7 días a 15-25°C o 1 mes a 2-8°C en el vial original

APTT reactivo

Fosfolípidos purificados con sílica coloidal como activador de contacto. Estabilidad después de reconstituido: 7 días a 15-25°C o 1 mes a 2-8°C en el vial original. No congelar

Proteína C activada humana coliofilizada con CaCl₂. Reconstituir con 2mL de agua desionizada. Estabilidad después de reconstituido: 2 horas a 37°C, 8 horas a 15-25°C 5 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C o temperatura inferior en el vial original

Control Plasma nivel 1.

Plasma humano liofilizado. Reconstituido con 1. mL de agua desionizada. Estabilidad después de reconstituido: 6 horas a 2-25 °C o 3 meses a 20°C o temperatura inferior en el vial original

Control plasma nivel 2.

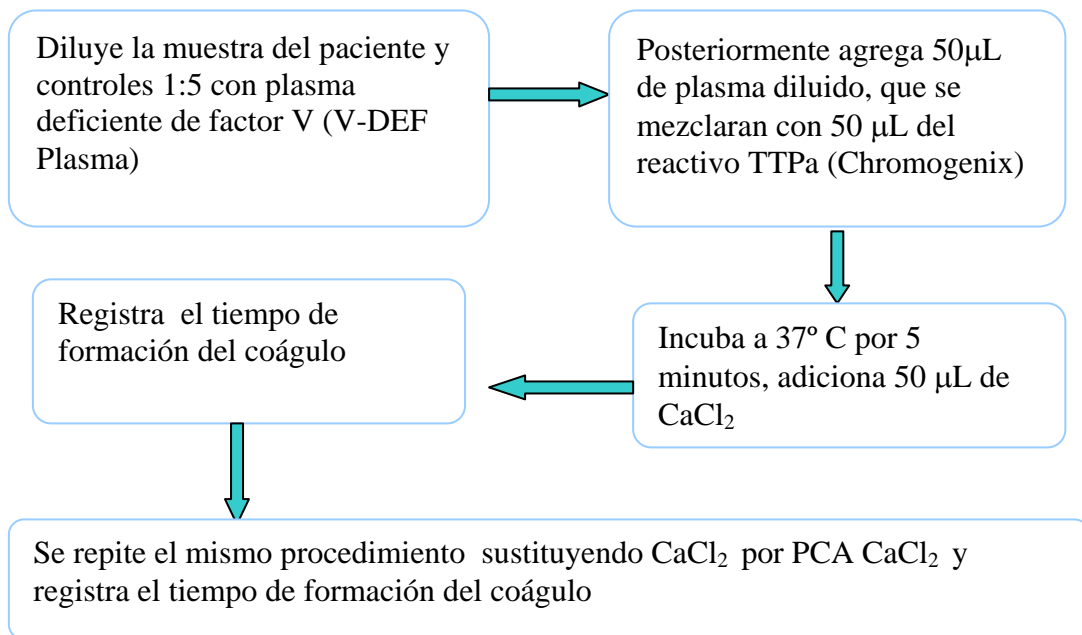
Plasma humano liofilizado. Reconstituido con 1 mL de agua desionizada. Estabilidad después de reconstituido: 6 horas a 2-25 °C o 3 meses a 20°C o temperatura inferior en el vial original.

Control de calidad.

Se utilizaron los plasmas control, nivel 1 y nivel 2 para la validación de las series de pruebas. El nivel 1 muestra una respuesta normal a APC, mientras que el nivel 2 muestra una respuesta consecuente a la presencia de la mutación V: Q⁵⁰⁶. Los rangos de valores esperados para las razones de APC-V están especificadas para cada lote.

Procedimiento.

Las muestras y los controles se emplearon sin diluir. El analizador STA diluye automáticamente las muestras y los controles.



Resultados

El cociente se calcula entre el TTPa en presencia de PCA sobre el TTPa en ausencia de ésta.

$$\text{Cociente} = \frac{\text{Tiempo de coagulación APC/CaCl}_2}{\text{Tiempo de coagulación CaCl}_2}$$

Valor de referencia del método

El cociente varía entre 2.0 y 2.5

Determinación de la actividad funcional de la proteína S

Esta prueba se basa en que la proteína S actúa como cofactor de la proteína C activada para inhibir los factores V y VIII activados. De esta forma, la proteína S prolonga el tiempo de coagulación de un sistema enriquecido con factor V activado el cual es un sustrato fisiológico para la proteína C activada. La adición de un plasma deficiente permite el suministro adecuado de fibrinógeno, y otros factores necesarios para la coagulación.

Reactivos

1. STA Proteína S Clotting Cat No. 147076 (Plasma deficiente de proteína S, Proteína C activada, Factor Va)
2. Plasma deficiente de proteína S, Proteína C activada, Factor Va.
3. Disolver el contenido de un frasco con 1,0 mL de agua desionizada. No agitar para evitar la formación de espuma. Antes del uso, dejar reposar 60 minutos de 15-25 °C. La estabilidad después de la reconstitución, en el analizador es 4horas.
4. STA Diluent Buffer Cat No.3138089
5. STA Calcium chloride (0.025 mol/l) Cat. No3138089
6. STA Unicalibrator Cat No.1776584
7. STA Preciclot Plus I Cat. No1776886
8. STA Preciclot Plus II Cat. No1776894

Calibración

La calibración se efectúa con STA Unicalibrator. Los valores de calibración están impresos en la metodología específica de cada lote. La calibración se efectúa automáticamente después de colocar el calibrador en el cajón para muestras. La curva de calibración aparece en la pantalla en el menú "Calibración".

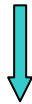
Procedimiento.

Las muestras y los controles se emplearon sin diluir. El analizador STA diluye automáticamente las muestras y los controles con solución tampón.

La muestra se diluye 1:10 con Amortiguador de Owren Koller



Adiciona 50µL de plasma diluido, 50µL de plasma deficiente en proteína S, 50µL del reactivo proteína C activada, 50µl del FVa e incubar 4 minutos a 37°C



Adiciona 50µl de cloruro de calcio 0.025 M y determinar el tiempo de formación del coágulo

Valor de referencia: Entre 70 y 130 %

Determinación de la actividad de Anti-Trombina III.

Al añadir un exceso de heparina al plasma problema diluido se forma el complejo ATIII-heparina, luego se añade un exceso de trombina que será neutralizada en parte por dicho complejo, quedando cierta cantidad de trombina residual, que actuando sobre el sustrato cromogénico liberará p-nitroanilina, de color amarillo. Cuanto menor sea el nivel de AT-III, mayores serán la trombina residual y el color amarillo generado.

Reactivos.

1. STA Diluent Buffer Cat No.3138089
2. Sustrato cromogénico STA Antitrombina 1447173
3. Solución de Antitrombina STA 1447173.
4. STA Unicalibrator Cat No.1776584

Procedimiento.

Las muestras y los controles se emplean sin diluir. El analizador STA diluye automáticamente las muestras y los controles con solución tampón.

Diluye las muestras, controles y plasma de calibración 1:30 con amortiguador de Owren-Koller



Incuba a 37°C 50 µL de muestra con 50µL de trombina en presencia de heparina



Añade 50 µL del sustrato cromogénico, para determinar la actividad residual de trombina. La paranitroanilina liberada y medida a 405nm es inversamente proporcional al nivel de AT-III.

Calibración.

El equipo realizó una curva de referencia con el plasma de calibración a una concentración exacta de AT-III, realiza diluciones del plasma de calibración con el tampón de Owren-Koller para obtener concentraciones a 100%, 50% y 0%, y medir la actividad de AT-III como se mencionó anteriormente, graficar los resultados obtenidos en segundos (ordenada) contra porcentaje de valor normal (abscisa).

Valor de referencia: entre 80 y 120%

Determinación del anticoagulante lúpico por Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido (DVV TEST).

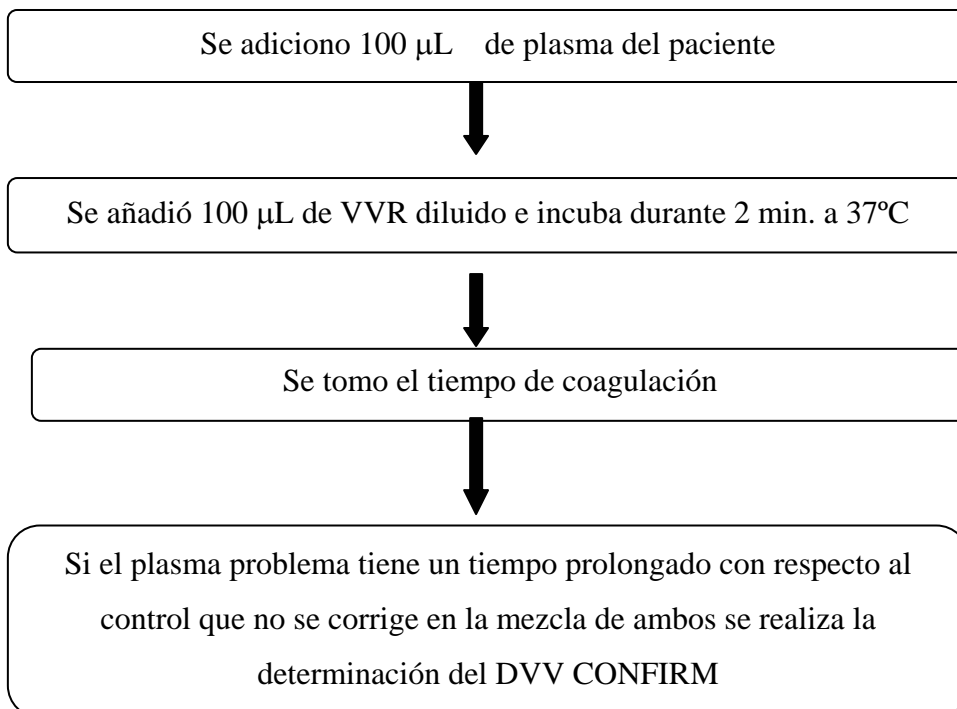
El veneno de Víbora de Russell activa directamente al factor X en Xa en presencia de Fosfolípidos y calcio, y completa la conversión de fibrinógeno en fibrina, que lleva la formación de un coágulo perceptible en el plasma, esta activación directa desvía el contacto con los factores de la vía intrínseca de la coagulación, excluyendo interferencias por deficiencias de los factores VII, IX, XI .y XII y sus respectivos inhibidores. La prueba de DVV también puede realizarse en las muestras con TTPa normal, la dilución y tipo de fosfolípidos contenidos en el reactivo aumenta la sensibilidad de la prueba y especificidad al anticoagulante lúpico.

Reactivos

DVV test de American diagnostic producto # 810.

El reactivo liofilizado contiene veneno de víbora de Russell, calcio y Fosfolípidos, se reconstituyo con 2 ml de agua desionizada o bidestilada. Antes de su uso se deja reposar una hora, el reactivo es estable 24 horas de 20°C-25°C en el vial original.

Procedimiento.



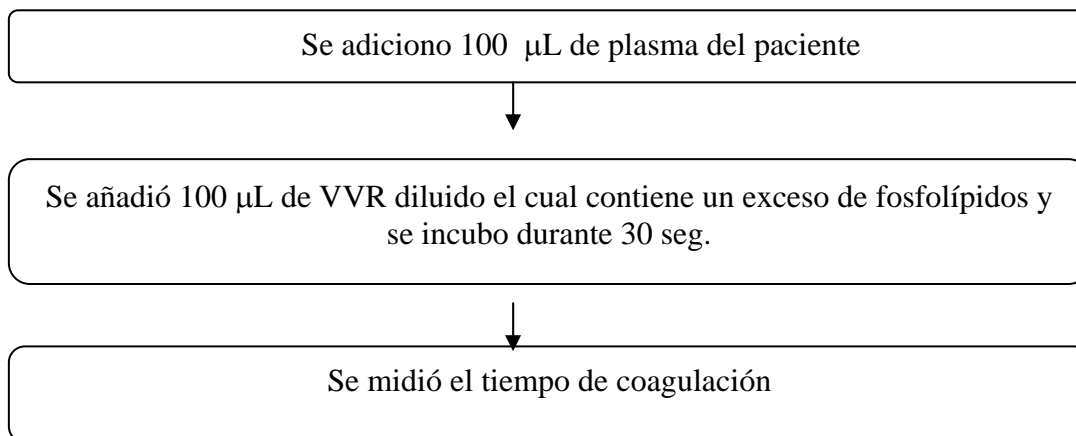
Determinación del anticoagulante lúpico por Tiempo de Veneno de Víbora de Russell diluido confirmatorio (DVV CONFIRM),

El reactivo de DVVconfirm confirma la presencia del anticoagulante lúpico (AL), combinado con veneno de víbora de Russell diluido, fosfolípidos concentrados, y calcio en un solo vial. Es un reactivo específicamente diseñado para el uso con el reactivo de DVVtest. El plasma de prueba con un resultado de DVVtest prolongado se le realizara el DVVconfirm. Las dos pruebas se comparan dividiendo el resultado de tiempo de coagulación del DVVtest por el resultado del tiempo de coagulación de DVVconfirm.

Reactivo

DVVconfirm producto #815, se reconstituyo con 1 mL. de agua desionizada o bidestilada, una vez reconstituido es estable durante 24 horas a temperatura ambiente en el vial original.

Procedimiento



$$\text{Cociente} = \frac{\text{DVV TEST}}{\text{DVV CONFIRM}}$$

Valor de referencia: El cociente menor de 1.4 (Negativo)

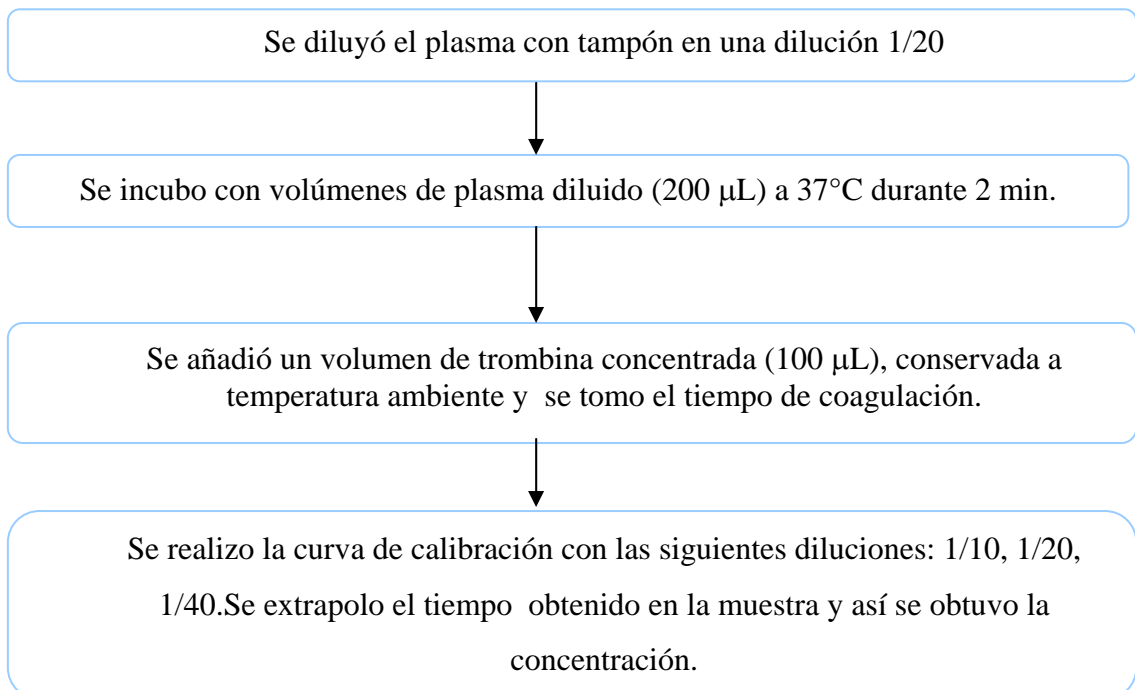
Determinación cuantitativa in Vitro del Fibrinógeno, por el método de Clauss.

Con un exceso de trombina, el tiempo de coagulación de una muestra plasmática diluida es directamente proporcional a la concentración de fibrinógeno. El reactivo contiene un inhibidor específico de heparina.

Reactivos

1. R1 Reactivo de fibrinógeno. Se reconstituyo el frasco con 2.0 mL de agua desionizada. Antes del uso, se dejo reposar el reactivo reconstituido por 30´a temperatura ambiente.
2. STA Preciclot Plus I Cat. No1776886
3. STA Preciclot Plus II Cat. No1776894
4. STA Diluent Buffer Cat No.3138089
5. STA Unicalibrator Cat No.1776584

Procedimiento



Valor de referencia: 200-400 mg/dL

10. RESULTADOS

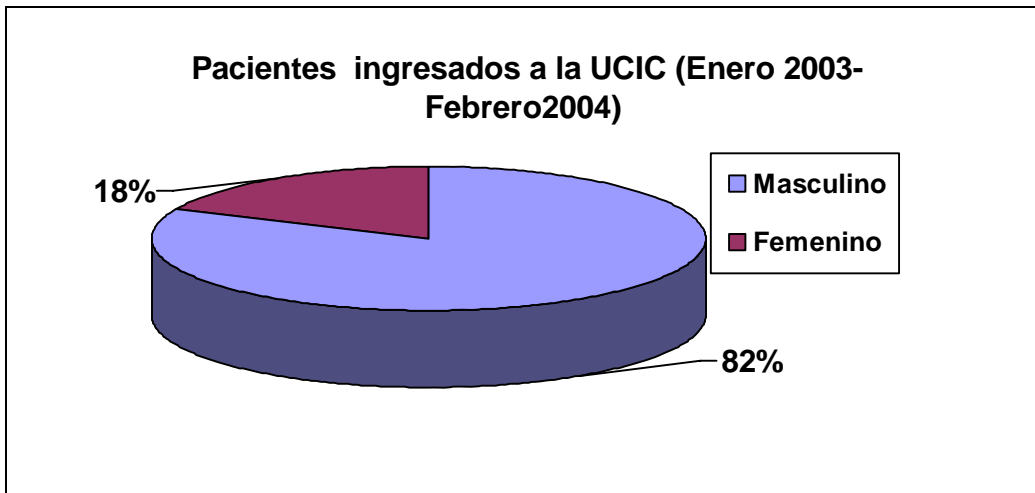


Gráfico No.1

Se muestra el total de pacientes de los sexos masculinos y femeninos ingresados a la UCIC con diagnóstico de infarto (n= 732).

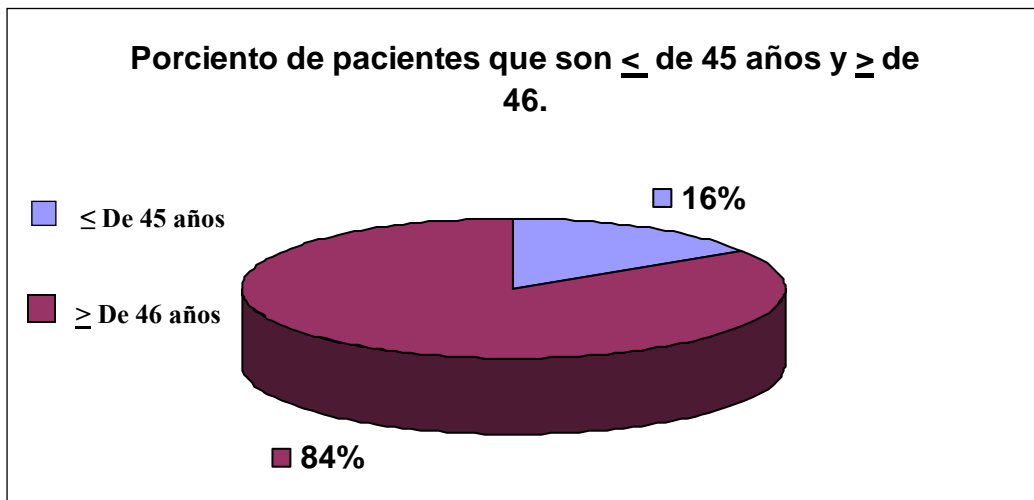


Gráfico No 2

Muestra el porcentaje de pacientes \leq de 45 años y \geq de 46 años, ingresados a la UCIC (Enero 2003-Febrero 2004)

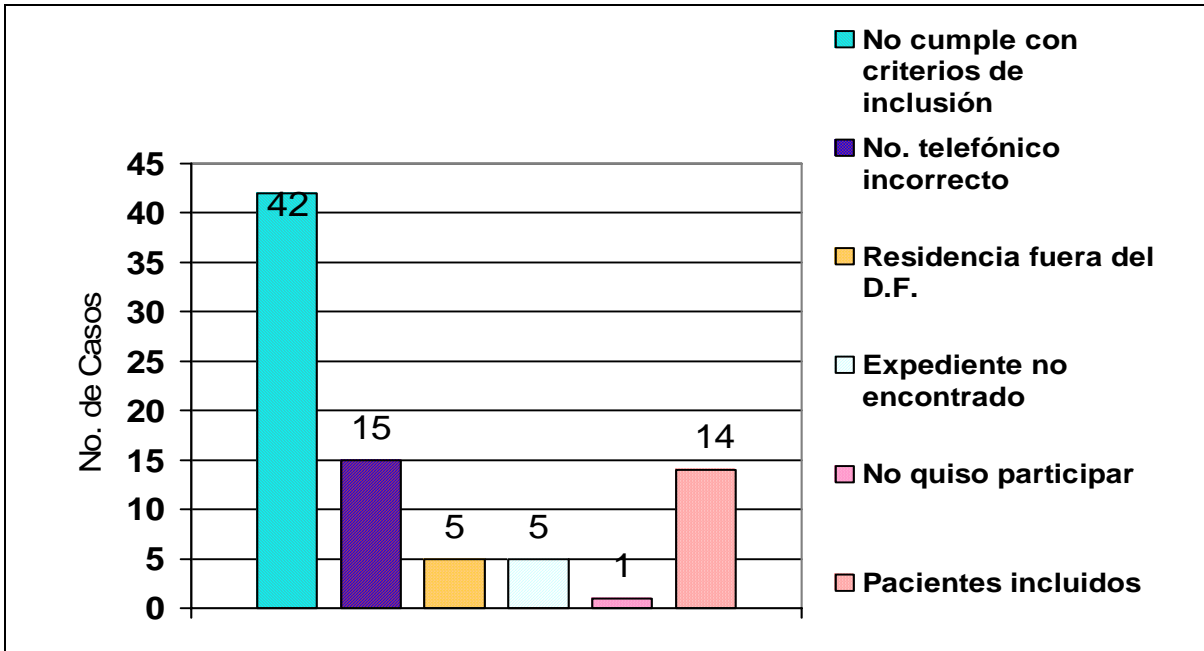


Gráfico No.3.

Muestra las causas por las cuales no se incluyeron los pacientes en el grupo de estudio y el número de pacientes incluidos en el protocolo.

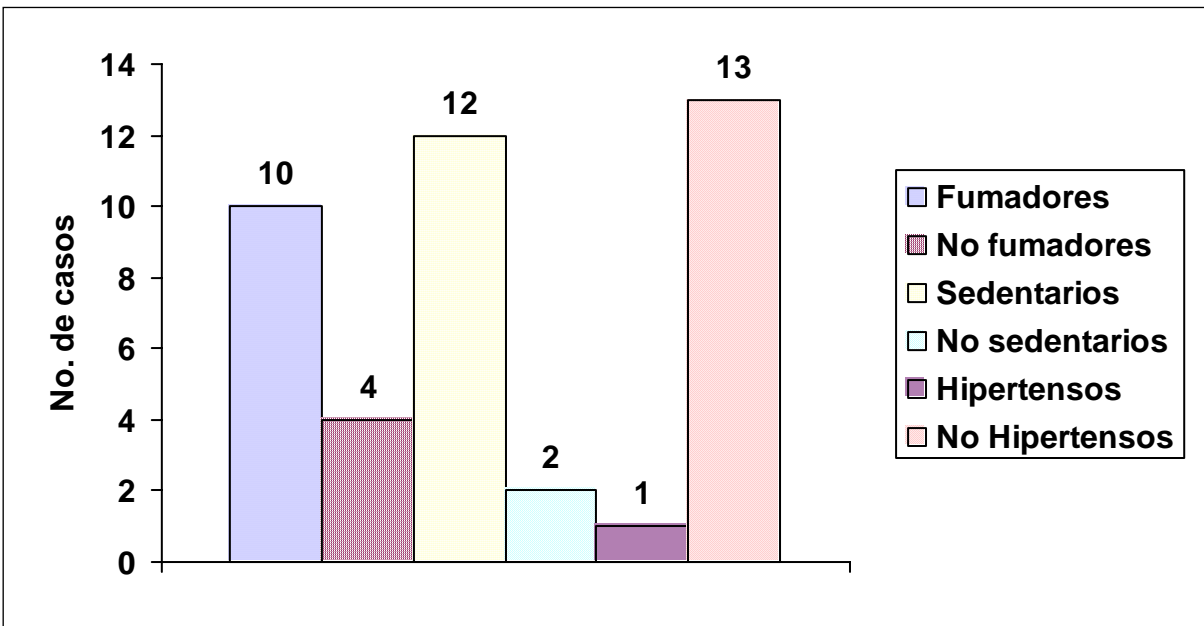


Gráfico No.4.

Factores de riesgo de los pacientes con infarto de miocardio menores de 45 años (grupo de estudio).

N	Valor Mínimo	Valor Máximo	Media	SD
14	26	45	38,29	5,030

Tabla No.1
Edad del grupo de estudio

AGONISTAS	N	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	MEDIA	SD
ADP (1µg/50µL)	14	16%	91%	64,21	22,699
ADP (0.5 µg/50µL)	14	5%	89%	36,71	29,119
ADP (0.25 µg/50 µl)	14	3%	19%	9,43	5,501
EPI (10 µM/mL)	9	16%	89%	52,00	25,884
EPI (1 µM/mL)	9	4%	9%	6,78	2,108
EPI (0.5 µM/mL)	9	1%	9%	6,22	2,949

Tabla No.2

Resultado de las agregometrias realizadas a varios pools en porciento de agregación plaquetaria Difosfato de adenosina (ADP) y Epinefrina (EPI) a diferentes concentraciones.

AGONISTAS	VALORES ANORMALES REPORTADOS EN LA LITERATURA
ADP (1µg/50µL)	>55%
ADP (0.5 µg/50µL)	>36%
ADP (0.25 µg/50 µl)	>12%
EPI (10 µM/mL)	>80%
EPI (1 µM/mL)	>27%
EPI (0.5 µM/mL)	>20%

Tabla. No 3

La tabla exhibe los valores anormales de agregación plaquetaria para las diferentes concentraciones de ADP y Epinefrina.

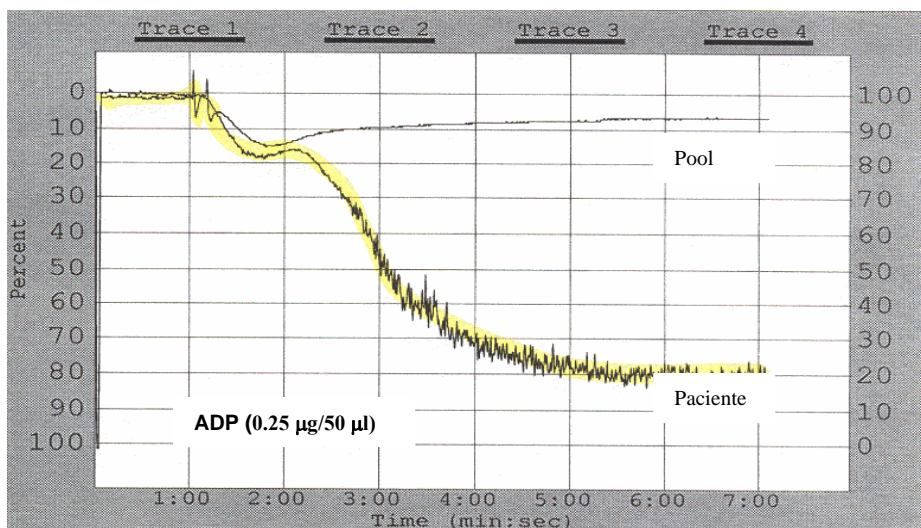


Gráfico No 5

Muestra un gráfico de agregación plaquetaria de un paciente del grupo de estudio, el cual presento agregación plaquetaria considerable con la tercera dilución de ADP (0.25 µg/50 µl)..

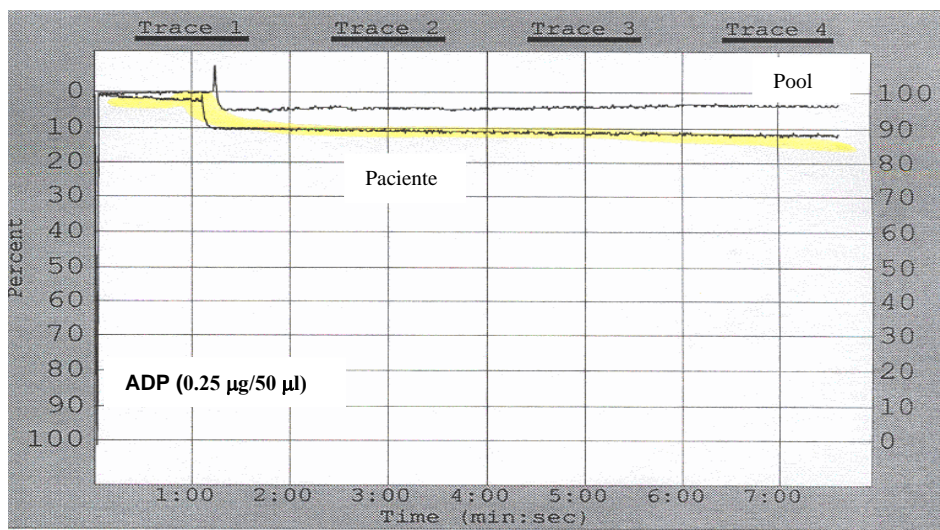


Gráfico No 6

Muestra un gráfico de agregación plaquetaria de un paciente que no presentó agregación con la tercera dilución de ADP (0.25 µg/50 µl)..

AGONISTAS	N	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	MEDIA	SD
ADP (1µg/50µL)	14	22%	81%	48,29	20,996
ADP (0.5 µg/50µL)	14	4%	82%	25,21	20,434
ADP (0.25 µg/50 µl)	14	2%	80%	20,57	22,336
EPI (10 µM/mL)	14	5%	89%	24,86	24,353
EPI (1 µM/mL)	14	5%	27%	13,29	6,855
EPI (0.5 µM/mL)	14	2%	19%	9,43	4,603

Tabla 4.

Muestra la estadística descriptiva de las agregometrias realizadas reportadas en porciento de agregación plaquetaria al grupo de estudio (\leq de 45 años) con las diferentes concentraciones de los agonistas.

AGONISTAS	N	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	MEDIA	SD
ADP (1µg/50µL)	5	3%	85%	35,80	32,275
ADP (0.5 µg/50µL)	5	3%	81%	24,40	31,997
ADP (0.25 µg/50 µl)	5	1%	10%	3,80	3,633
EPI (10 µM/mL)	5	9%	72%	24,80	26,902
EPI (1 µM/mL)	5	1%	54%	15,40	21,755
EPI (0.5 µM/mL)	5	0%	5%	3,00	2,345

Tabla 5.

Muestra la estadística descriptiva de las agregometrias realizadas al grupo de comparación (\geq de 60 años) con las diferentes concentraciones de los agonistas.

AGONISTAS	P < 0.05
ADP (1µg/50µL)	1.000
ADP (0.5 µg/50µL)	.500
ADP (0.25 µg/50 µl)	.068
EPI (10 µM/mL)	.680
EPI (1 µM/mL)	.893
EPI (0.5 µM/mL)	.043

Tabla No 6.

Test Estadístico rango Willcoxon de las agregometrias realizadas al grupo control (GC) y el grupo de comparación (GC).

	PS	PC	AT-III	RPCa	AL
GRUPO DE ESTUDIO(≤ de 45 años) n= 14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
GRUPO DE COMPARACION(≥ de 60 años) n= 5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla No.7

Muestra los resultados de proteína (PS), proteína C (PC), antitrombina III (AT-III), resistencia a la proteína C activada (RPCa), anticoagulante lúpico (AL) del grupo de estudio y del grupo de comparación.

	N	Valor máximo	Valor mínimo	Media	SD
Fibrinógeno GE (mg/dL)	14	192	735	318,64	130,026
Fibrinógeno GC (mg/dL)	5	326	486	383,60	61,569
Viscosidad sanguínea GE (Cp)	14	3,530	5,800	4,72643	0,840738
Viscosidad sanguínea GC (Cp)	5	3,65	5,87	4,7720	0,99354

Tabla No.8

Resultados de las pruebas de fibrinógeno y viscosidad sanguínea para el grupo control y grupo de comparación

	Correlación de Pearson	Significancia
Viscosidad sanguínea(Cp)- Fibrinogeno(mg/dL) GE	-0.218	0.453
Viscosidad sanguínea(Cp)- Fibrinogeno(mg/dL) GC	0.360	0.552

Tabla No.9

Correlación de Pearson entre el grupo de estudio y el grupo de comparación.

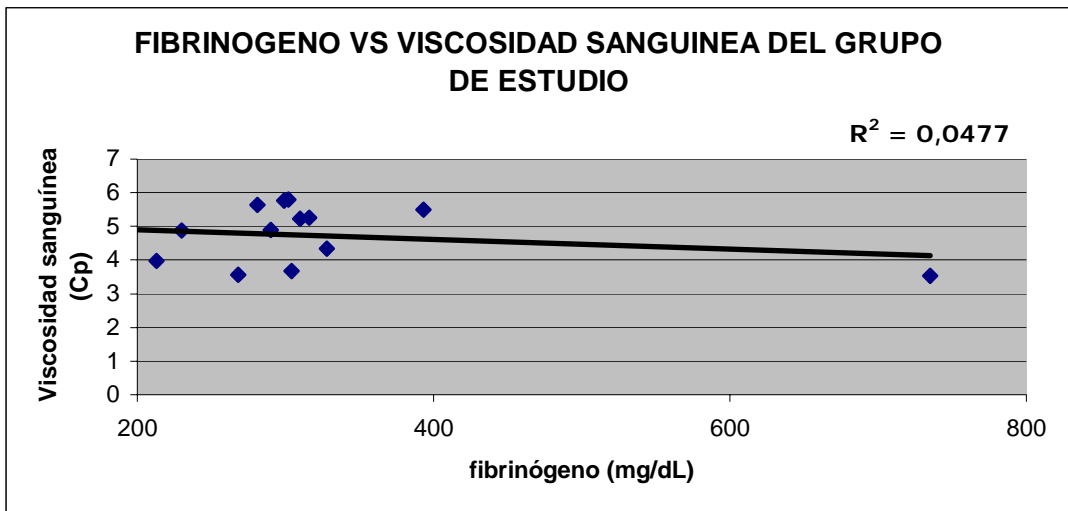


Grafico 7.

Gráfico de regresión lineal para las variables de Fibrinogeno vs. Viscosidad del grupo de estudio.

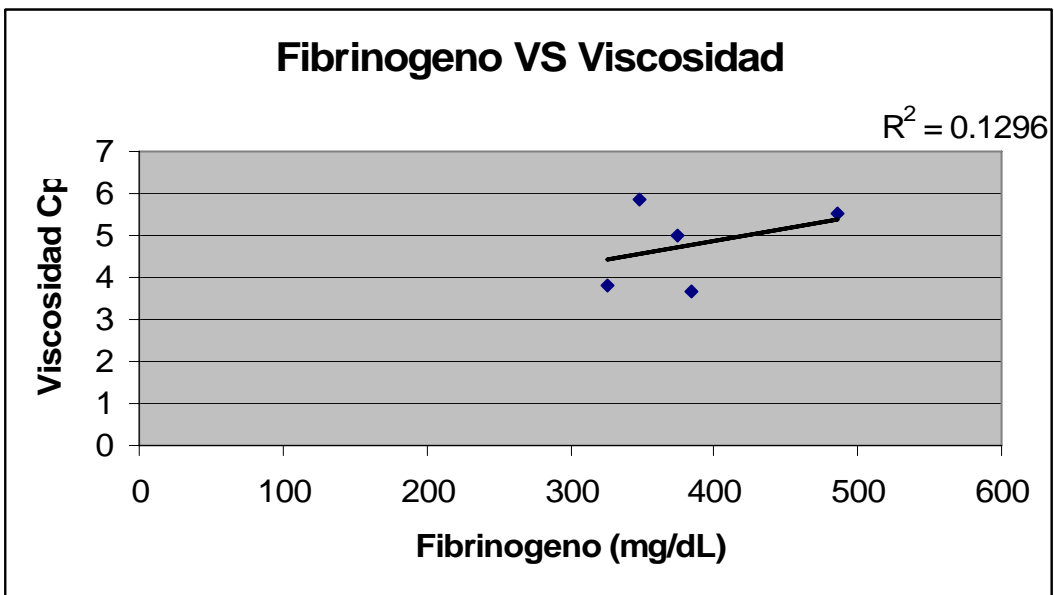


Grafico 8.

Gráfico de regresión lineal para las variables de Fibrinogeno vs. Viscosidad del grupo de comparación.

Resultados de Homocisteina en ayunas ($\mu M/L$)	Valores de referencia
Media=9.4092 SD = 1.8560 Valor Máximo = 12.36 Valor Mínimo = 6.886	Normal: 5-15 $\mu M/L$ Moderado: 16-30 $\mu M/L$ Intermedio:31-100 $\mu M/L$ Severo:>100 $\mu M/L$

Tabla No. 10

Resultados de la determinación de homocisteina plasmática en los pacientes del grupo de estudio

	Estadística descriptiva	2 h HCYS ($\mu M/L$)	4 HCYS ($\mu M/L$)	6h HCYS ($\mu M/L$)	8 h HCYS ($\mu M/L$)	10 HCYS ($\mu M/L$)
Grupo de estudio (n=5)	Media=	27.17	32.76	34.42	37.13	37.192
	SD=	6.344	4.74	5.48	7.17	7.24
	V. Máximo =	37.81	40.1	43.146	48.22	48.5
	V. Mínimo =	21.42	27.38	28.613	29.79	30.4
Controles (n=3)	Media=	20.94	27.72	31.89	33.99	33.34
	SD=	4.46	7.99	11.32	11.52	12.81
	V. Máximo =	24.24	35.47	44.34	45.657	46.47
	V. Mínimo =	15.86	19.50	22.32	22.61	20.86

Tabla No.11

Resultados de la concentración de homocisteina de los pacientes a los que se les realizo la carga oral de metionina (COM), a diferentes tiempos contra los controles.

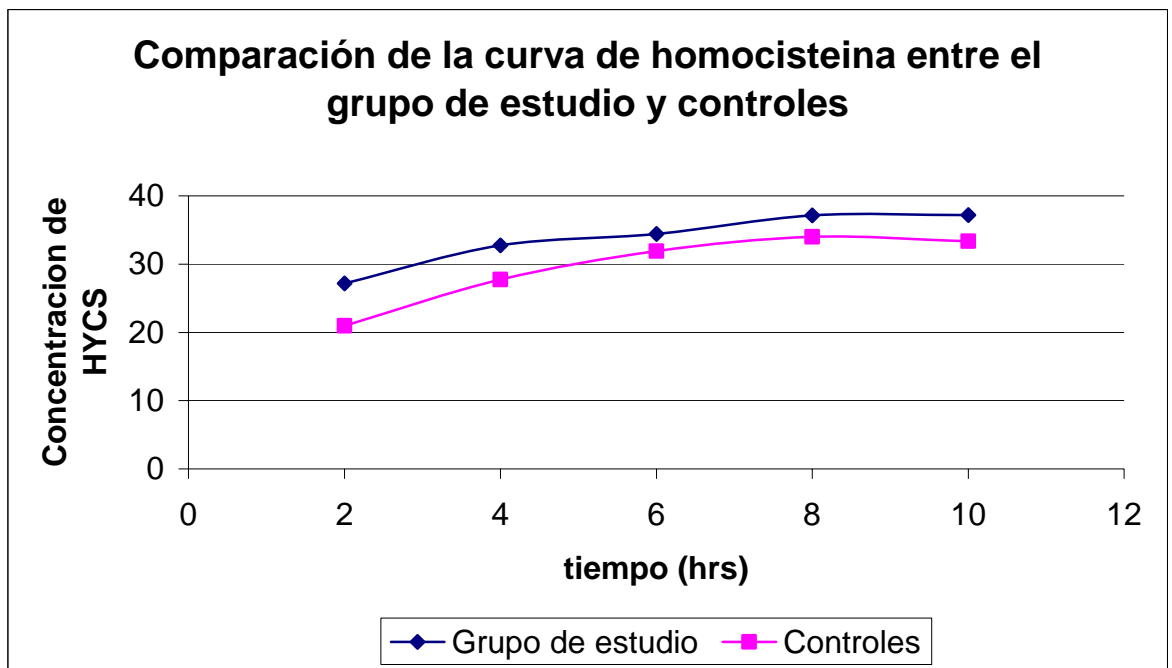


Grafico No. 9

Muestra las medias de la concentración de homocisteína en $\mu\text{M/L}$ de los pacientes a los que se les realizó la carga oral de metionina (COM), en diferentes tiempos contra los 3 controles.

12. CONCLUSIONES

En los pacientes menores de 45 años con Infarto del Miocardio estudiados se encontró que los factores de riesgo tradicional para enfermedad coronaria, es el tabaquismo, sedentarismo y que existe mayor frecuencia de infarto de miocardio en hombres que en mujeres. En los estudios realizados no se encontró significancia estadística ($p < 0.05$), en los valores de agregación plaquetaria al compararlo con los pacientes mayores de 60 años, en las dos primeras diluciones para ambos agonistas. 4 pacientes del grupo de estudio presentaron hiperagregación plaquetaria. No se encontró deficiencia de las proteínas anticoagulantes (PC, PS, AT-III) ni resistencia a la proteína C activada, y presencia de anticoagulante lúpico.

Los pacientes infartados menores de 45 años no cursan con hiperviscosidad sanguínea ni los del grupo de comparación.

Con el grupo estudiado no se puede obtener un análisis concluyente, es necesario continuar con el estudio iniciado para hacer más grande la casuística sobre todo en las determinaciones de la agregación plaquetaria y realizar otros estudios como la determinación de Homocisteína como factor de riesgo cardiovascular.

14.ANEXOS

ANEXO I
CARTA DE CONSENTIMIENTO
ESTUDIO DE FACTORES TROMBOFILICOS Y
HEMORREOLOGICOS EN PACIENTES CON INFARTO AL
MIOCARDIO MENORES DE 45 AÑOS

PACIENTE: _____ AFILIACION: _____
FECHA: _____ EDAD _____

El presente proyecto que hemos explicado a Usted, pretende investigar a través de un par de muestras sanguíneas, una teoría que explique su padecimiento y posiblemente también justifique un tratamiento en forma más congruente.

El Infarto del corazón en personas jóvenes, es una enfermedad poco común (uno de cada 9 adultos) pero que aflige cada vez más frecuentemente a gente joven y que como se le ha explicado su causa aún no está bien establecida.

El estudio que se le propone, consiste en la toma de sangre para analizar las características de la coagulación de su sangre y con ello demostrar o no la importancia de tener que tomar medicamentos como la aspirina o el anticoagulante; de aceptar ingresar al estudio, deberá suspender el medicamento 5 días antes; desde luego esto tiene un riesgo que aunque sea pequeño debe considerar, por lo que si Usted no acepta, no desmeritará su atención en el IMSS.

Desde luego el estudio será totalmente confidencial, pero Usted estará enterado de los resultados y en su oportunidad de la posibilidad de ser tratado en una forma más racional. Acepto la toma de muestra

PACIENTE

TESTIGO

ANEXO II
FORMA DE REGISTRO DE PACIENTE
(FRP)
ESTUDIO DE FACTORES TROMBOFILICOS Y
HEMORREOLOGICOS EN PACIENTES CON INFARTO AL
MIOCARDIO MENORES DE 45 AÑOS

NOMBRE _____ AFILIACION _____
EDAD _____ SEXO M__ F__ OCUPACION _____
TELEFONO _____ FACTORES DE RIESGO: _____
TABAQUISMO SI__ NO__ AÑOS ____ NUMERO _____
PESO IMC _____ TA _____ mmHg
MEDICAMENTOS ORALES _____, _____, _____
_____, _____, _____

ANEXO III

**FORMA DE RESULTADOS DE VISCOSIDAD SANGUINEA
ESTUDIO DE FACTORES TROMBOFILICOS Y
HEMORREOLOGICOS EN PACIENTES CON INFARTO AL
MIOCARDIO MENORES DE 45 AÑOS**

Nombre _____

Fecha _____

Hematocrito _____ **Temperatura** _____

rpm	% de Torque	cP	Shear stress	Shear rate

rpm	% de Torque	cP	Shear stress	Shear rate

ANEXO IV

FORMA DE RESULTADOS DE PRUEBAS DE TROMBOFILIA

ESTUDIO DE FACTORES TROMBOFILICOS Y HEMORREOLOGICOS EN PACIENTES CON INFARTO AL MIOCARDIO MENORES DE 45 AÑOS.

Nombre	Afiliación
--------	------------

PRUEBA	PACIENTE	VALOR DE REFERENCIA
PS		Entre 65-140%
PC		Entre 70-130%
AT-III		Entre el 80-120%

Anticoagulante lúpico (Tiempo de veneno de víbora de russel)

PRUEBA	PACIENTE	VALOR DE REFERENCIA
Dvv Test		29-51 seg.
Dvv confirm		21-46 seg.
Cociente		<1.4 (Negativo)

Prueba confirmatoria de RPCa con cofactor -V técnica modificada

PRUEBA	PACIENTE	VALOR DE REFERENCIA
APC-R STA		2.0-2.5

PRUEBA	PACIENTE	VALOR DE REFERENCIA
Fibrinógeno		200-400mg/dL

ANEXO V

GLOSARIO

Adhesión plaquetaria: Se define como, la adhesión de las plaquetas a la pared vascular dañada será el primer paso, donde rápidamente se activarán y dará lugar a la formación del trombo plaquetario. El proceso de adhesión se puede dividir en una fase inicial de contacto y en una fase posterior de extensión de las plaquetas sobre el endotelio vascular.

Agonistas plaquetarios: Son agentes inductores de agregación plaquetaria, que activan a las plaquetas y fisiológicamente permiten a la plaqueta reaccionar adecuadamente ante una lesión y pueden ser trombina, ADP, epinefrina y colágena, cada agonista tiene un receptor específico.

Agregación plaquetaria: Se define como agregación plaquetaria a la interacción entre plaqueta y plaqueta, requiriéndose para este proceso la integridad metabólica de las mismas, dado que este mecanismo incluye cambios morfológicos y químicos de los trombocitos.

Agregometría óptica: Valoración de la respuesta plaquetaria, que se basa en la diferencia de densidad óptica (transmitancia) que existe entre el plasma rico (PRP) y el plasma pobre (PPP). A medida que las plaquetas se agregan y permiten el mayor pasaje de luz, disminuyendo la densidad óptica, se inscriben las curvas de agregación en función del tiempo.

Antitrombina III: Es un inhibidor de serín-proteasas sintetizado en el hígado que se encuentra en plasma a una concentración de 2,4 μM . Es el principal inhibidor de la trombina y del factor Xa. La molécula de antitrombina se une a la molécula de heparina a través de una secuencia discontinua de residuos básicos (Lys, Arg) en la zona aminoterminal. La trombina se une también a la cadena de heparina de una manera no específica mediante cargas electrostáticas. De esta manera, se forman complejos ternarios heparina –AT-trombina en los que el sitio activo de la trombina se acerca al sitio reactivo de la AT. Inicialmente, la trombina rompe el enlace

Arg393-Ser394 en e el sitio reactivo de la AT; esto produce un cambio conformacional de la AT, que atrapa de forma irreversible a la trombina.

Fase fluida de la hemostasia: La fase fluida es una compleja serie de reacciones bioquímicas de los factores hemostáticos. La meta de la fase fluida es convertir una proteína plasmática soluble, el fibrinógeno, en otra insoluble, la fibrina.

Fibrinógeno: Es una glucoproteína de 340Kd sintetizada en el hígado. Tiene una vida media de unos 3-4.5 días y en plasma se encuentra a una concentración de 2 a 4 g/L. El fibrinógeno es una proteína formada por dos pares de tres cadenas polipeptídicas no idénticas llamadas A α , B β , y g, unidas por puentes disulfuro. Es un reactante de fase aguda y su concentración aumenta en el cáncer, la inflamación y el embarazo.

Hiperhomocisteinemia: la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo para enfermedad arterial coronaria, periférica, cerebral y de trombosis venosas. Los niveles anormales de homocisteína pueden ser ocasionados por la interacción de factores genéticos y nutricionales. La hiperhomocisteinemia primaria constituye un padecimiento autosómico recesivo que inicia a edad temprana con el daño a vasos sanguíneos, homocistinuria y trombosis. Las enzimas primordialmente afectadas son: cistationina B-sintetasa, 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa y metiltetrahidrofolato homocisteína metil transferasa⁴². Clínicamente los pacientes inician antes de los 30 años de edad con presencia de trombosis arteriales coronarias, cerebrales y periféricos, además de presentarse en asociación con trombosis venosas. El diagnóstico se establece mediante la determinación plasmática de la homocisteína.

Hemorreología: Bajo un punto de vista etimológico, la palabra hemorreología se refiere al estudio del flujo sanguíneo (hemo=sangre; reos=fluir). En general se puede decir que la hemorreología trata del funcionamiento de la sangre en los vasos sanguíneos, de sus interacciones y de sus repercusiones clínicas.

Hemostasia: La hemostasia puede ser comparada como una balanza asentada sobre un punto de apoyo ,que mantiene un equilibrio constante, por un lado se encuentra la necesidad fisiológica de mantener la sangre líquida permitiendo una circulación fluida con objeto de llevar oxígeno y elementos nutricionales a los tejidos y en el otro extremo se encarga de detener el flujo, localmente en un lugar lesionado.

Hemostasia primaria: La hemostasia primaria es el cierre inmediato de la lesión vascular por vasoconstricción y activación plaquetaria sin que se forme fibrina.

Hemostasia secundaria: A la formación de fibrina por medio de la fase fluida se le considera hemostasia secundaria y su función es mantener más tiempo el coágulo.

Homocisteína: Es un aminoácido con un grupo sulfhidrilo libre (aminoácido azufrado), derivado metabólico del aminoácido metionina, por esta razón la dieta que contiene abundante metionina requiere de niveles suficientes de folatos, cobalamina y piridoxina para prevenir la hiperhomocisteinemia.

Homocistinuria: Es un defecto metabólico resultado de la deficiencia de cistationine b-sintetasa, los pacientes homocigotos presentan trombosis arterial y trombosis venosas antes de los 30 años de edad junto con otras manifestaciones clínicas, que incluyen retraso mental, osteoporosis. Los pacientes heterocigotos se asocian generalmente con trombosis arterial. El mecanismo por el cual se desencadena la trombosis en estos casos es la citotoxicidad a la célula endotelial y alteración en los mecanismos hemostáticos vasculares.

Mecanismo anticoagulante de la proteína C: El mecanismo anticoagulante de la PC, se inicia cuando se genera una pequeña cantidad de trombina, esta se une a la trombomodulina y el complejo trombina trombomodulina activa a la proteína C unida a los fosfolípidos de la membrana o al receptor endotelial de la proteína C. La PC activada junto con la proteína S y el factor V que actúan como cofactores, tiene como principal sustrato al factor Va al que degrada rompiendo 2 enlaces: el primero en la Arg 506 que produce una rápida pero incompleta pérdida de actividad y después en la Arg 306, con lo que la inactivación del factor Va es completa.

Plaquetas: Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos de los megacariocitos de la médula ósea. Miden de 2 a 3 mm de diámetro, tiene forma discoide, circulan en la sangre durante 10 días y sus valores normales oscilan entre 150 y 450 X 10⁹/L.

Proteína C: La PC es una glucoproteína de 62 Kd que se codifica en el cromosoma 2, tiene síntesis hepática como una molécula de una sola cadena, la cual es convertida en una molécula de dos cadenas. La PC sufre una carboxilación en presencia de vitamina K; nueve residuos de ácido glutámico son transformados en ácido γ -carboxiglutámico (dominios-Gla). La concentración de PC en plasma es de 65 nM. Su

actividad funcional es de 70 al 120%. La PC es el precursor de la proteasa de serina Proteína C activada (PCa). Una vez activada la proteína C (PCa) se une a los fosfolípidos de membrana o al receptor endotelial de la proteína C y actúa como un potente anticoagulante degradando los factores Va y VIIIa. En esta actividad proteolítica actúan como cofactores la proteína s y el propio factor V.

Proteína S: La Proteína S (PS) es una glucoproteína plasmática de 70 Kd, codificada en el cromosoma 3, la cual es sintetizada en el hígado, pero también en megacariocitos y células endoteliales, es un cofactor de la PC que también requiere de vitamina K. La PS sirve como cofactor no enzimático de la PCa en la inactivación de los Factores V y VIII. La PS se encuentra en el plasma bajo dos formas: una forma libre (40%) y en forma unida a la proteína C4b (60%), sin embargo, solo la forma libre es activa como pro-cofactor de la PC, favoreciendo su fijación a los fosfolípidos plaquetarios.

Resistencia a la proteína C: La RPCa constituye un defecto autosómico dominante, debido a una mutación en el gen que codifica para el FV. El descubrimiento por Dahlbäck de esta nueva alteración molecular se efectuó al estar efectuando ensayos con PC activada (PCa) en plasmas de pacientes con trombofilia no explicada. Dahlbäck se percató que la PCa era incapaz de prolongar *in vitro* el valor del tiempo de la tromboplastina parcial activada (TTPa) como habría de esperar; es decir su plasma era "resistente" a la acción de la PCa.

Reología: Reología se define como "el estudio de los cambios en la forma y el flujo de la materia, elasticidad, viscosidad, y plasticidad". Y la viscosidad está, más allá definida como "La fricción interior del fluido, causada por atracción molecular que lo hace resistir a fluir".

Shear stress: Es la fuerza que actúa paralelamente a la superficie del vaso, sobre cada unidad de área de flujo en movimiento, y se expresa en dina/cm².

Shear rate: Es la diferencia de velocidad entre dos capas adyacentes del fluido en movimiento por unidad de distancia entre ambas, si se toma el cm como unidad de distancia, se expresa en cm/seg/cm= seg⁻¹.

Síndrome de la plaqueta pegajosa (SPP): Es una entidad de relativamente reciente identificación que supone trastornos en la agregabilidad de las plaquetas caracterizados por incremento anormal de la misma y en consecuencia tendencia a la ocurrencia de fenómenos vasooclusivos, tanto arteriales como venosos.

Trombofilia: Puede definirse como la predisposición individual a padecer episodios tromboembólicos, y en sentido amplio que afecta el territorio venoso o arterial.

Trombofilia primaria: Se define como una tendencia determinada genéticamente al desarrollo de trombosis y corresponde a deficiencias hereditarias de los inhibidores naturales, la AT-III, PC, PS, Plasminógeno (PlG), disfibrinogenemias, etc. que constituyen defectos relativamente pocos comunes y el defecto hereditario más frecuente la resistencia a la proteína c activada (RPCa).

Trombofilia secundaria o adquirida: Corresponde a una serie de trastornos en los que existe mayor riesgo de trombosis por otros mecanismos en los que no hay un defecto genético, es decir se deben a factores de riesgo adquiridos como, obesidad, cáncer insuficiencia cardiaca, cirugía embarazo y puerperio, anticoagulante lúpico.

Trombosis: Obstrucción patológica de la luz vascular o del corazón.

Viscosidad: La viscosidad es la medida de la fricción interior de un fluido. Esta fricción se pone de manifiesto cuando una capa del fluido se hace mover con respecto a otra capa. A mayor fricción, exige mayor cantidad de fuerza para causar este movimiento que es el deslizamiento. El deslizamiento ocurre siempre que el fluido se mueva físicamente o se distribuye, como vertiendo, extendiendo, rociando, mezclando, etc. los fluidos muy viscosos, por consiguiente, exigen más fuerza que los materiales menos viscosos.

Viscosímetros: Equipos utilizados para la determinación de la viscosidad sanguínea, que en líneas generales constan: de un sistema capaz de hacer variar la velocidad de deslizamiento, para cada velocidad de deformación, y un sistema que mantenga constante la temperatura, ya que la viscosidad es inversamente proporcional a la misma.

ANEXO VI

DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEINA EN SUERO Y PLASMA.

La homocisteína (HCYS) es un aminoácido formado durante la conversión de metionina a cisteína. El metabolismo de la HYCS involucra dos vías metabólicas: 1) transulfuración con la vitamina B₆ como cofactor y 2) remetilación para formar metionina, para el cual un derivado del ácido fólico es el donador del grupo metilo y la vitamina B₁₂ es el cofactor (1). El análisis usado mide la HYCS total, tanto la forma reducida como la oxidada, por lo tanto, el término homocisteína es apropiado.

Recolección de muestras

Se requiere plasma con EDTA o suero de sujetos en ayunas, para prevenir que los valores de HYCS se vuelvan falsamente elevados, separar inmediatamente después de que las muestras sean colectadas. Las muestras deberán ser almacenadas en congelación $\leq -70^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Instrumentos

- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución.
- detector de fluorescencia.
- Columna Hypersil ODS de 4.6 x 230mm.
- Centrifuga para tubos Eppendorf.
- Baño de agua eléctrico.
- potenciómetro.
- Vortex.

Materiales

- Tributillfosfina, grado reactivo, aprox. 90% (sigma).
- Dimetil formamida, grado reactivo (Sigma).
- Ácido Perclorico, reactivo certificado.(Aldrich Chemical)
- Etilendiamina tetraacetato disódico (EDTA) reactivo certificado.
- Acido bórico , reactivo certificado.
- 7- fluorobenzo-oxa-1,3 diazol-4-sulfonato(SBDF), grado reactivo (sigma).
- Acetato de sodio, grado reactivo(sigma).
- Metanol, grado HPLC.
- Ácido acético glacial, grado HPLC.
- DL-Homocisteína grado reactivo (sigma).
- Ácido clorhídrico. reactivo certificado.
- Tubos Eppendorf.
- viales de inyección con insertos de microvolumenes.
- Agua milliQ.
- Filtros HA (Millipore)

Preparación de los reactivos.

Fase móvil.

- a) Solución 1. Agregar 11.5 mL de ácido acético glacial en 1 L de agua desionizada.
- b) Solución 2.- Acetato de sodio trihidratado 0.20 M. Disolver 27.22 g de acetato de sodio en 1 L de agua desionizada, para obtener una concentración final de 0.20 M.
- c) Fase móvil de trabajo. Medir el pH de 1L de solución de ácido acético glacial (preparado en el paso (a) de arriba). Gradualmente agregar, mientras se está agitando, la solución de acetato de sodio (prepararla en el paso (b) de arriba), hasta que se obtenga un pH de 4.0. Agregar 20 mL de metanol por litro de fase móvil hasta arriba del frasco de filtración. La fase móvil es estable por cerca de una semana de 20-25°C y por cerca de un mes a 4-8°C.
- d) Ácido Bórico 2.5 M EDTA 4 mM-pH 9.5 y 10.5
- e) pH = 9.5. Disolver 0.3723 g de EDTA en 200 mL de agua desionizada. Agregar 38.69 g de ácido bórico. Ajustar el pH a 9.5 por adición de pellets de NaOH (30

± 7 pellets). Llevar el volumen a 250 mL con agua desionizada a un matraz volumétrico.

- f) pH= 10.5 Disolver 0.7445 g de EDTA disódico en 400mL de agua desionizada. Agregar 77.3875 g de ácido bórico. Ajustar el pH a 10.5 por adición de pellets de NaOH (30 ± 7 pellets). Llevar el volumen a 500mL con agua desionizada en un matraz volumétrico.

Ácido perclórico (PCA) 0.6 mol/L con solución de EDTA 1 mM. Agregar 186 mg de EDTA, mezclar y ajustar el volumen a 500 mL. Este reactivo puede ser almacenado a temperatura ambiente, y es estable por al menos 3 meses a 20-25° C.

Reactivo de SBDF. Cada día de análisis, disolver 5 mg de ácido 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfónico (SBDF) en 5 mL de ácido bórico de pH 9.5 en un tubo Corning de 15 mL.

Tributilfosfina (TBP) al 10% en Dimetil formamida (DMF)

Preparar este reactivo el día de la corrida, después de que las muestras son alícuotas. Este es un agente reductor, que rompe todos los compuestos disulfuro libres. **PRECAUCION:** El TBP es extremadamente sensible al aire. Para remover 1 mL de TBP del frasco, llenar una jeringa de 3 mL con 1.5 mL de He o N₂, e inyectar este gas a través del septum del frasco. Entonces sacar 1 mL de la solución del frasco.

Removiendo 1 mL de TBP de esta manera, se mantiene una presión positiva en el frasco, previniendo que el aire tenga contacto con el TBP, agregar el mL de TBP en la jeringa a 9 mL de DMF en un matraz no necesita estar tapado en este momento, pero deberá estar cubierto con papel obscuro para proteger el contenido de la luz. Mezclar esta solución suavemente por agitación.

Estándares.

- a) Estándar Stock de HYCS-1.0 mMol/L: Disolver 0.02684 g de DL-homocisteina (PM = 268.4, Sigma) en 100 mL de HCL IN. Poner alícuotas de 1 mL de solución Stock en criotubos de 1.5 mL de capacidad y almacenar a -80°C. Estos estándares por al menos 6 meses a -80°C.

- b) Estándar de trabajo de HYCS-40 nM/mL. Preparar el estándar de stock con agua desionizada en un matraz volumétrico de 25 mL.

Procedimiento

Inicio

Poner las condiciones del HPLC como se muestra en la siguiente tabla

Parámetro	Valor
Velocidad de Flujo (mL/min)	1.2
Tiempo de corrida (min)	8.0
Detección de fluorescencia longitud de onda(nm)	Excitación = 385, Emisión =515
Volumen de inyección (µL)	40
Rango de linealidad (nMol/mL)	2.0-200.00

Preparación de la muestra.

1. Dejar que las muestras se descongelen a temperatura ambiente (20-25°C)
2. Agitar las muestras en el vortex.
3. Agregar 100 µL de muestra, controles de calidad o estándares en tubos Eppendorf de propileno de 1.5 mL
4. Adicionar 10 µL de la solución TBP a cada muestra usando una pipeta repetidora.
5. Agitar vigorosamente cada muestra en Vortex.
6. Tapar los viales y colocar las muestras en un refrigerador durante 30 minutos.
7. Adicionar 100 µL de solución PCA y agitar las muestras en vortex, hasta que las muestras estén totalmente precipitadas.
8. Centrifugar las muestras en una centrifuga eppendorf durante 4 minutos.

- 9.** Adicionar 80 μL del sobrenadante a 160 μL del ácido bórico pH 10.5 en un vial de inyección.
- 10.** Adicionar 80 μL del reactivo SBDF a las muestras. Tapar los viales y agitar el contenido en Vortex.
- 11.** Incubar las muestras a 60° C durante 60 minutos en un baño de agua. Las muestras deberán volverse amarillo brillante durante el curso de la incubación.
- 12.** Colocar los viales en un carrusel del automuestreador. Empezar La inyección después de que las muestras se han puesto a temperatura ambiente.

15. REFERENCIAS

1. Secretaria de salud. Comunicado de prensa No 206, 12/septiembre/2004;http://www.salud.gob/ssa_app/noticias/datos/2004-09-12-991.html
2. Mateo J, Santamaría, Borrell M, Souto JC, Fontcuberta J. Trombosis e Hipercoagulabilidad. Hematología Clínica, 4a.ed Harcourt, Barcelona 2001:675-677
3. Veludo T, Márquez V, Simoes V, et. al. Perfil Clínico, Cinecoronariográfico e Evolutivo precoce de Pacientes Jovenes con Infarto agudo do Miocárdio na Era Trombolítica. Arquivos Brasileiros de Cardiología . 1997; 68 (6) :
4. Glover. M, Kuber MT, Warren SE, Vieweg WVR. Myocardial infarction before age 36: risk factor and arteriographic analysis. Am J. Cardiol 1983; 99:1600-1603.
5. Terpos E, Athanasiou A, Tsoukala C, Anastasopoulou J, Kyriakidis M, Karafoulidou A. Thrombophilic factors in patients with Syndrome X. Thrombosis Research 2000;97:525-527.
6. Elliot M, Braunwald E. Infarto agudo al miocardio, En: Harrison's Principios de Medicina Interna. Mex :15 edic. Mc Graw Hill , 2002: 1629.
7. Uddin SN, Begum F, Malik F, Rahman S. Coronary artery disease in young patients: clinical review and risk factor analysis. Mymensingh Med J. 2003; 12(1):3-7.
8. Isordia S.I. El fibrinógeno como factor de riesgo cardiovascular. Revista Mexicana de Patología Clínica. 1997: 44.1.
9. Qizilbash N, Jones L, Warlow Ch and Mann. Fibrinogen and lipid concentrations as risk factors for transient ischaemic attack and minor isqemic strokes. BMJ. 1991; 303: 605-609.
10. ECAT angina pectoris Study Group. ECAT angina pectoris study baseline associations of haemostatis factors with extent of coronary arteriosclerosis and other risk factors in 3000 patients with angina pectoris undergoing coronary angiography. Eur Heart J 1993; 14:8-17.
11. Peerschke E. Evidence of interaction between platelet fibrinogen receptor. Blood 1982; 60:973-78.

12. Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan K, Larson B, Welin L, Tubblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1984;311:501-5.
13. Ernst E. Fibrinogen, A cardiovascular risk factor. *Clinical Hemorheol* 1992; 12:805-816.
14. Kannel W, Wolf P, Castelli W, D'Agostino R. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. *JAMA* 1987; 258:1183-86.
15. Ernst E. The role of fibrinogen as a Cardiovascular risk factor. *Atherosclerosis* 1993; 100:1-12.
16. Peerschke E, Zucker M, Grant R, Egan J, Johnson M. Correlation between fibrinogen to human platelet and platelet aggregability. *Blood* 1980; 55:841-47.
17. Marguerie G, Edgington T, Plow E. Interaction of fibrinogen with its platelet aggregation. *J Biol Chem* 1980; 255:154-61.
18. Handa K, Kono S, Sku K. Plasma fibrinogen levels as an independent indicator of severity of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1989; 77:209-213
19. Kannel W, D'Agostino R, Belanger A. Fibrinogen cigarette smoking and risk of cardiovascular disease: Insights from the Framingham study. *Am Heart J* 1987; 113:1006-10.
20. Lee A, Lowe G, Woodwork M, Tunstall Pedoe H. Fibrinogen in relation to personal history of prevalent hypertension, diabetes, stroke intermittent claudication, coronary heart disease and family history: The Scottish Heart Health Study. *Br Heart J* 1993; 69:338-42.
21. Lowe GDO. Blood rheology in arterial disease. *Clin Science* 1986; 75:138-46.
22. Chávez Negrete A, Frati MA, Amato MD, Argüero R. Hemodilución de gran volumen en la eritrocitosis secundaria. *Rev Med IMSS (Méx.)* 1987;25-47
23. Ernst E and Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor. *Ann Intern Med* 1993; 118:956-63.
24. Koenig W, Sund M, Ernst E et al. Association between rheology and Components of lipoproteins in humans blood. Results of the MONICA project. *Circulation* 1992; 85:2197-2204. 30
25. Bloch KJ and Maki DG Hyperviscosity syndrome associated with immunoglobulin abnormalities. *Seminars in hematology* 1973; 10:113-124.

26. Isordia IS, Jauregui RA, Chávez-Negrete A. Fibrinógeno como componente reológico en síndrome X. *Rev Mex Cardiol* 1997;8:10-14.
27. Bugiardini R, Pozzati A, Ottani F et al. Vasotonic angina: a spectrum of ischemic syndromes involving functional abnormalities of epicardial and miocardiovascular coronary circulation. *JACC* 1993; 22:417-25.
28. Lewandowski K, Kwaśnikowski P, Elikowski P, Zawilska K. Myocardial infarction in patients aged less than 40 years. Frequency of BcII polymorphism in the fibrinogen β -chain gene and plasma fibrinogen. *Polish Heart Journal* 2003; 59(9):205-12.
29. Holiday PL, Mammen E, Gilroy J. Sticky platelet syndrome and cerebral infarction in young adults. Presented at the Ninth International Joint Conference on Stroke and Cerebral Circulation; 1983 (abstract). Phoenix, Arizona. *Circulation* 1983 (suppl).
30. Bick RL. Sticky platelet syndrome: A common cause of unexplained arterial and venous thrombosis. *Clin Appl Thromb/hemost* 1998; 4:77.
31. Mammen EF. Ten years experience with the "sticky platelet syndrome" *Clin Appl thromb/hemost* 1995;1:66
32. Mammen EF: Sticky platelet syndrome. *Sem Thromb Hemost* 1999; 25:361.
33. Rubenfire M, Blevins R. D, Barnhart M, Housholder S, Selik N, and Mammen E.F Platelet Hyperaggregability in Patients with Chest Pain and Angiographically Normal Coronary Arteries. *Am. J. Cardiol.* 1986; 57: 657-660
34. Bojesen SE, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Platelet glycoprotein IIb/IIIa Pl(A2)/Pl(A2) homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 2003 ;42(4):661-7.
35. Rallidis LS, Belesi CI, Manioudaki HS, Chatziioakimidis VK, Fakitsa VC, Sinos LE, Laoutaris NP, Apostolou TS. Myocardial infarction under the age of 36: prevalence of thrombophilic disorders. *Thromb Haemost.* 2003 ;90(2):272-8.
36. Mateo J, Santamaría, Borrell M, Souto JC,. Fisiología y exploración de la hemostasia. En: *Hematología Clínica*. Barcelona: Harcourt 4a.ed; 2001:597-617.
37. Dahlbäck B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg 506 to Gln mutation in factor V as a

- pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 1995;74:139-148.
38. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blomback M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction *N Engl J Med.* 1985;313:1557-63
 39. Aznar J, Estellés A, Tormo et al. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Br Heart J* 1988;59:53
 40. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992;268: 877-881
 41. Szczeklik A, Sanak M, Jankowski M, Dropinski J, Czachor R, Musial J, Axenti I, Twardowska M, Brzostek T, Tendera M. Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia. *Am J Med Genet.* 2001 ;101(1):36-9
 42. Qujeq D, Omran TS, Hosini L. Correlation between total homocysteine, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in the serum of patients with myocardial infarction. *Clin Biochem.* 2001;34(2):97-101
 43. Salkind NJ, Akeytm. Using SPSS for windows. Analysing and understading data. New Jersey: Prentice-Hall, 2001
 44. Marques MJ. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas, Mc Graw-Hill, Mex 1991 246-248