



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD
FARMACOLOGÍA CLÍNICA

“ACTIVIDAD FIBRINOLÍTICA DE LAS MICROPARTÍCULAS EN PACIENTES DIABÉTICOS CON INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO CON ELEVACIÓN DEL SEGMENTO ST Y EN TRATAMIENTO CON HIPOGLUCEMIANTES ORALES”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD CON CAMPO DEL CONOCIMIENTO EN
FARMACOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:
DANIELA REYES MUNGUÍA

TUTOR
DRA. MIRTHALA FLORES GARCÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Daniela Reyes Munguía

ALUMNA



Dra. Mirthala Flores García

TUTOR DE TESIS



Dra. Maria del Carmen Jiménez
Martínez

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD
ACADÉMICA

Contenido

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	11
3. Marco Teórico	15
3.1. ¿Cómo estudiar la coagulación?.....	18
3.2. Micropartículas y su relación con enfermedades crónico-degenerativas.....	22
4. Planteamiento del problema.....	28
5. Pregunta de investigación.....	29
6. Justificación.....	29
7. Hipótesis.....	30
8. Objetivo general.....	30
9. Objetivos particulares.....	30
10. Metodología.....	31
10.1. Diseño del estudio.....	31
10.2. Cálculo de tamaño de muestra:	31
10.3. Criterios de inclusión en el estudio.....	32
10.4. Criterios de exclusión en el estudio.....	33
10.5. Criterios de eliminación en el estudio.....	33
10.6. Descripción operativa.....	34
10.7. Variables de estudio.....	34
10.8. Variables de confusión.....	37
11. Material, métodos y procedimientos.....	37
11.1. Obtención de muestra de sangre.....	37
11.2. Extracción de micropartículas.....	37
11.3. Cuantificación de proteína de las micropartículas.....	38
11.4. Actividad fibrinolítica.....	39
12. Análisis estadístico.....	40
13. Consideraciones éticas.....	40
14. Consideraciones de bioseguridad.....	40
15. Resultados.....	42
16. Discusión.....	53
17. Conclusiones.....	54

18.	Perspectivas.....	56
19.	Anexos.....	57
20.	Bibliografía.....	59

1. Resumen.

Actualmente, se propone que las micropartículas (MPs) o microvesículas tienen una función importante en la salud y enfermedad, debido a que están presentes en sujetos sanos y su concentración se modifica en diversas enfermedades. Se ha reportado una asociación entre su presencia y las características de las MPs con la evolución y predicción de riesgo cardiovascular. Las MPs son fragmentos de membrana heterogéneas, liberadas por células activadas, en estrés o en apoptosis. Miden de entre 0.1 y 1 μm , carecen de simetría y exponen fosfolípidos de carga negativa, como la fosfatidilserina. Estas MPs son vectores que pueden viajar por el torrente circulatorio, tener una comunicación directa con otras células, iniciar y propagar actividad proteolítica de forma eficiente debido a la información que lleva (como activadores de plasminógeno tipo tisular (t-PA) y uroquinasa (u-PA), el receptor del u-PA (u-PAR) y microRNAs (miRNAs) endógenos que participan en la regulación del sistema fibrinolítico), lo que amplifica el mecanismo fibrinolítico ampliamente conocido para destruir la fibrina. Estos hallazgos sugieren que las micropartículas contribuyen de forma importante en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y/o trombóticas, por lo que estas vesículas circulantes prometen ser un valioso biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de dichas patologías.

Pregunta de investigación.

¿Cuál es la diferencia en la actividad fibrinolítica de las micropartículas en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, diabéticos tipo 2, en tratamiento con hipoglucemiantes orales, comparados con aquellos en

tratamiento con estatinas?.

Objetivo.

Comparar la diferencia entre la actividad fibrinolítica de las micropartículas en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST diabéticos tipo 2, en tratamiento con hipoglucemiantes orales y en aquellos tratados con estatinas.

Metodología.

Estudio observacional, retrospectivo, transversal analítico. Realizado en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INC). Se obtuvieron muestras de sangre (anticoagulada con citrato de sodio al 3.2 %) de pacientes diabéticos tipo 2 con infarto agudo de miocardio, con elevación del segmento ST, y en tratamiento con hipoglucemiantes orales. Se obtuvo el plasma libre de células mediante una doble centrifugación (1500 x g por 15 min y 13,000 x g por 5 min, a temperatura ambiente) y se extrajeron micropartículas mediante centrifugación diferencial (20000 x g por 90 min a 4 °C), se lavaron (2 veces) y guardaron a -80 °C hasta su utilización, con amortiguador HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM; pH 7.4).

Posteriormente, se realizó choque térmico y se determinó la concentración de proteína de micropartículas mediante espectrofotometría (a 280 nm). Finalmente, se determinó la generación de plasmina mediante un método cromogénico.

Se extrajeron variables de interés del expediente electrónico y se empleó el programa estadístico SPSSv26.0 para hacer el análisis de los datos.

El protocolo fue previamente aceptado por el comité de Ética y de Investigación

(No. de registro: 18-1043) del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Los pacientes incluidos en este estudio firmaron el respectivo consentimiento informado.

Resultados.

Comparando pacientes diabéticos (n = 51) versus no diabéticos (n = 27), respectivamente; La mayoría de los pacientes que participaron en el estudio (n = 78) fueron del sexo masculino (80.4 y 85.2 %), con una edad, IMC, antecedente de hipertensión y tabaquismo activo similar entre grupos. Existe diferencia estadística significativa en los pacientes con antecedente de tabaquismo (58.8 y 88.9 %) y dislipidemia (29.4 y 62.9 %).

Además, la concentración de proteína de micropartículas circulantes de los pacientes no diabéticos es 30 % mayor respecto a los diabéticos.

De las 78 muestras obtenidas, se realizó la determinación de generación de plasmina de 49 muestras (n = 22 de pacientes diabéticos y, n = 27 de no diabéticos), por lo tanto, se realizó un subanálisis de esos datos. Al comparar los resultados de los no diabéticos versus los diabéticos, los resultados muestran que los pacientes no diabéticos generan mayor concentración de MPs y plasmina, con una diferencia de 18 % y 68 %, respectivamente.

Abstract.

Currently, it is proposed that microparticles (MPs) or microvesicles have an important role in health and disease because they are present in healthy subjects and their concentration is modified in various diseases and evidence has even been

reported indicating an association between presence and characteristics of MPs with the evolution and prediction of cardiovascular risk. MPs are heterogeneous membrane fragments, released by activated cells in stress or in apoptosis. They measure between 0.1 and 1 μm , lack symmetry and expose negatively charged phospholipids such as phosphatidylserine. These MPs are vectors that can travel through the bloodstream, have direct communication with other cells, initiate and propagate proteolytic activity efficiently due to the information they carry (such as tissue-type plasminogen activators (t-PA) and urokinase (u-PA), the u-PA receptor (u-PAR) and endogenous microRNAs (miRNAs that play a role in the regulation of the fibrinolytic system), which amplifies the widely known fibrinolytic mechanism to destroy fibrin. These findings suggest that microparticles contribute significantly to the development of cardiovascular and/or thrombotic diseases, which is why these circulating vesicles promise to be a valuable biomarker for the diagnosis and prognosis of these pathologies.

Research question.

What is the difference in the fibrinolytic activity of microparticles in patients with acute ST segment elevation myocardial infarction, type 2 diabetes, treated with oral hypoglycemic agents between those treated with statins?.

Objective.

Compare the difference between the fibrinolytic activity of microparticles in patients with acute myocardial infarction with ST segment elevation, type 2 diabetes treated with oral hypoglycemic agents and in those treated with statins.

Methods.

Observational, retrospective, analytical cross-sectional study. Carried out at the Ignacio Chávez National Institute of Cardiology (NIC). Blood samples (anticoagulated with 3.2% sodium citrate) were obtained from type 2 diabetic patients with acute myocardial infarction with ST segment elevation, and on treatment with oral hypoglycemic agents. Cell-free plasma was obtained by double centrifugation (1500 x g for 15 min and 13,000 x g for 5 min, at room temperature) and microparticles were extracted by differential centrifugation (20,000 x g for 90 min at 4 °C), washed (2 times) and stored at -80 °C until use, with HEPES buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl; pH 7.4).

Subsequently, heat shock was performed and the protein concentration of microparticles was determined by spectrophotometry (at 280 nm). Finally the generation of plasmin was determined using a chromogenic method.

Variables of interest were extracted from the electronic file and the statistical program SPSSv26.0 was used to analyze the data.

The protocol was previously accepted by the Ethics and Research Committee (Registration No.: 18-1043) of the NIC. The patients included in this study signed the respective informed consent.

Results.

Comparing diabetic patients (n = 51) versus non-diabetic patients (n = 27), respectively; The majority of patients who participated in the study (n = 78) were male (80.4 % and 85.2%), with similar age, BMI, history of hypertension, and active smoking between groups. However, there is a significant statistical difference in

patients with a history of smoking (58.8 and 88.9%) and dyslipidemia (29.4 and 62.9%).

Furthermore, the protein concentration of circulating microparticles in non diabetic patients is 30% higher than in diabetics.

Of the 78 samples obtained, plasmin generation was determined in 49 samples (n = 22 from diabetic patients and n = 27 from non-diabetics), therefore, a subanalysis of these data was performed. When comparing the results of non-diabetics versus diabetics, the results show that non-diabetic patients generate more MPs and plasmin concentration, 18% and 68 %, respectively.

2. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Son la principal causa de defunción en todo el mundo, con el 80 % en países en vías de desarrollo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019).

No obstante, la diabetes mellitus (DM) encabeza la lista de enfermedades de morbimortalidad en México. Asociándose en gran medida a complicaciones micro y macrovasculares, así como a un aumento del riesgo para ECV. Ambas enfermedades afectan a países de ingresos bajos y medianos; catalogadas como enfermedades de origen multifactorial. Dado que la prevalencia de la diabetes mellitus está aumentando en todo mundo, se ha estimado que en 2030 habrá aproximadamente 552 millones de personas con DM, de las que más de un 95 % tendrán DM tipo 2 (DM2) (Chiva-Blanch et al. 2016).

Estadísticas de salud del año 2017, muestran que el 72.5 % de la población en México, mayores de 15 años, tanto hombres como mujeres, presentan sobrepeso u obesidad, cifras alarmantes, ya que es uno de los factores de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares, así como diabetes mellitus (OECD, 2017).

La hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo para enfermedades isquémicas cardíacas. Estudios poblacionales mundiales han mostrado que la prevalencia de hipertensión arterial en adultos mayores de 35 años es de 41 %, de los cuales solamente el 46.5 % son conscientes de ser hipertensos y de aquellos que son conscientes el 87.9 % está recibiendo tratamiento farmacológico, pero solo el 32.5 % de los que reciben tratamiento está

bien controlado para una cifra de control global de apenas el 18 % (Gómez et al. 2019).

Otros factores de riesgo para dichas enfermedades, enlistados por la OMS, son: tabaquismo, dislipidemia, sedentarismo y dieta no balanceada (OMS, 2019).

Además de las funciones hemostáticas que se conocen de las plaquetas, hoy en día se reconocen sus funciones: trombosis, inflamación, remodelación tisular y posiblemente, en los mecanismos de defensa innata. Derivado de esto los pacientes con resistencia a la insulina o diabéticos cursan con disfunción plaquetaria caracterizada por hiperactividad (adhesión y agregación) de las plaquetas y resistencia de estas a la inhibición de la insulina sobre su función. En la DM2 se altera el metabolismo plaquetario debido a cambios en las vías de señalización intraplaquetaria. La mala regulación de la actividad plaquetaria es clave en la patogénesis de la aterosclerosis y de las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus tipo 2 (Matadamas-Zárate et al. 2009; Guzman-Grenfell et al. 2005).

A pesar de los múltiples programas de prevención por parte de todas las instituciones de salud y afines, que incluyen medidas como: actividad aeróbica, dieta balanceada, eliminar el tabaquismo, mantenerse dentro del índice de masa corporal (IMC) correspondiente, tratamiento farmacológico oportuno y adecuado control metabólico entre otros, no han sido suficientes para frenar este problema de salud pública. Lo que repercute en la calidad de vida de nuestra población y aumenta los costos por enfermedad dentro del país. Un estudio del INC, pionero en la atención de pacientes con enfermedades cardiovasculares; menciona que durante el primer trimestre del año 2019 (enero-marzo) dentro de las primeras 10

causas de morbilidad y mortalidad de la sede hospitalaria, la principal es la enfermedad isquémica del corazón. Engloba el 31.4 % y 32.1 % de morbimortalidad, respectivamente (Estadísticas Instituto Nacional de Cardiología. 2019).

Los factores de riesgo mencionados previamente, que se involucran en las enfermedades cardiovasculares, tienen su proceso inicial en la formación de aterosclerosis; una enfermedad que comienza desde la concepción del hombre. Determinada por placas irregulares que se encuentran en la íntima de las arterias de grande y mediano calibre. La lesión fundamental se denomina ateroma, placa ateromatosa o placa fibrograsa y está compuesta, en su gran mayoría por colesterol y ésteres de colesterol (lípidos) que se acumulan en su centro. A estos los cubre una placa fibrosa, por lo que toma volumen y aumenta de tamaño hacia la luz arterial afectando su circunferencia. Al principio de este padecimiento las placas fibrograsas se encuentran en lugares determinados de la arteria, pero, mientras estas progresan, se hacen más numerosas y llegan a ocupar grandes extensiones. Con este progreso pueden ocluir la luz arterial e invadir la media subyacente, ocasionando eventos de origen isquémico cardiovasculares y cerebrales, considerándose a esta entidad una reacción inflamatoria crónica de la pared arterial que tiene su génesis en forma de lesión endotelial. La aterosclerosis es un evento crónico y silencioso, generalmente ignorado y desconocido por el paciente, la cual provoca graves consecuencias en los órganos y sistemas. (Hernández-Puentes 2016).

Esto ha propiciado que diversos investigadores dediquen sus esfuerzos a la realización de múltiples investigaciones sobre el tema. Las plaquetas, ampliamente conocidas por su participación tanto en la hemostasia primaria como en la

fisiopatología de eventos trombóticos, concentran sobre su superficie los fosfolípidos negativos de su membrana como el factor tisular (FT) y los factores de la coagulación circulantes, de esta manera facilitan las interacciones entre ellos, generando la trombina. (Chiva-Blanch et al. 2016; Varon & Shai. 2015).

Además, actualmente se reconoce que las plaquetas no solo participan en el balance de la hemostasia (hemorragia - trombosis), sino también en la modulación de la inflamación, remodelación tisular y en los mecanismos de defensa innata. Derivado de esto, los pacientes con resistencia a la insulina o diabéticos cursan con disfunción plaquetaria caracterizada por hiperactividad (adhesión y agregación) de las plaquetas y resistencia de estas a la inhibición de la insulina sobre su función. En la DM2 se altera el metabolismo plaquetario debido a cambios en las vías de señalización intraplaquetaria. La mala regulación de la actividad plaquetaria es clave en la patogénesis de la aterosclerosis y de las complicaciones vasculares de la DM2 (Guzman-Grenfell et al. 2005; Matadamas-Zárate et al. 2009).

Actualmente, se propone que las micropartículas (MPs) o microvesículas tienen una participación importante en la salud-enfermedad, debido a que están presentes en sujetos sanos y su concentración se modifica en diversas enfermedades, como las enfermedades cardiovasculares. Las MPs son fragmentos de membrana heterogéneas, liberadas por células activadas, en estrés o en apoptosis. Miden de entre 0.1 y 1 μm , carecen de simetría y exponen fosfolípidos de carga negativa, como la fosfatidilserina. Estas MPs son vectores que pueden viajar por el torrente circulatorio, tener una comunicación directa con otras células, iniciar y propagar actividad proteolítica de forma eficiente debido a la información que lleva (como u-

PA, t-PA, u-PA y miRNAs endógenos que participan en la regulación del sistema fibrinolítico), lo que amplifica el mecanismo fibrinolítico ampliamente conocido para destruir la fibrina (Chiva-Blanch et al. 2016; Varon & Shai 2015) (Figura 1 y 2).

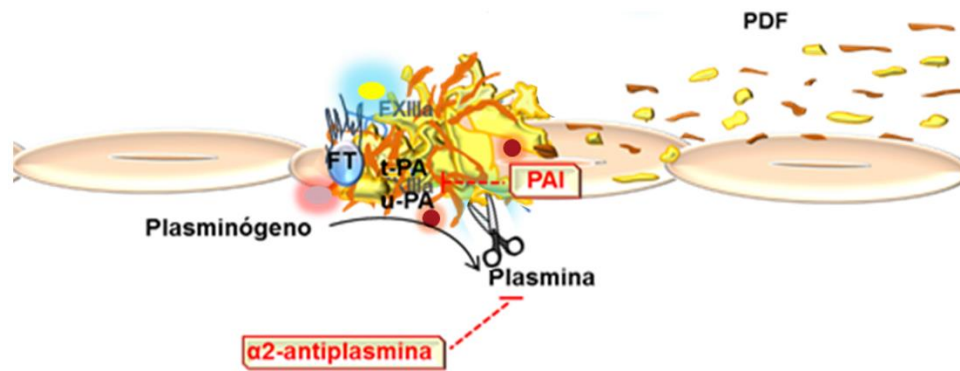


Figura 1. Representación esquemática del modelo de fibrinólisis tradicional. Tomado y modificado de Espinoza & Reverter 2001.

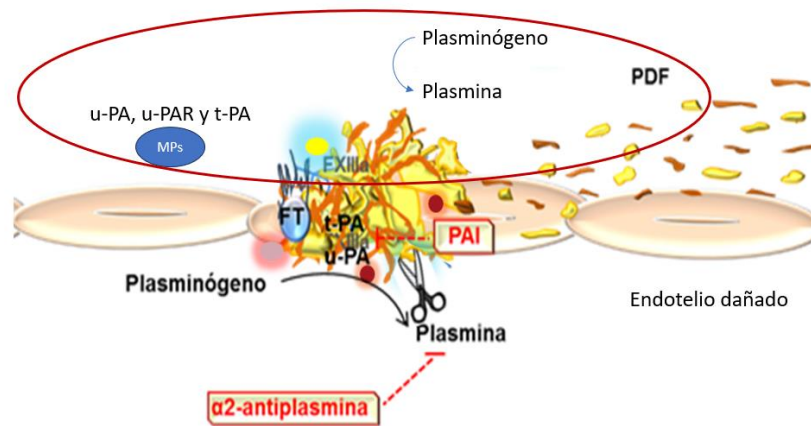


Figura 2. Representación esquemática de cómo las micropartículas pueden amplificar la fibrinólisis tradicional. Adaptado de Espitia-Huerter 2015.

3. Marco Teórico

Actualmente se reconoce que existen (al menos) tres tipos de vesículas celulares: los cuerpos apoptóticos, las micropartículas y los exosomas (Figura 3). La

diferencia radica principalmente en el tamaño, mecanismo que la genera y la información que transporta. Las MPs son pequeñas vesículas de membrana entre 0.1 y 1 μm , liberadas por la mayoría de las células del organismo (como: plaquetas, eritrocitos, leucocitos, células endoteliales, sincitiotrofoblasto, células tumorales, entre otras), durante los procesos de activación celular, estrés o apoptosis. Son una población heterogénea de pequeñas vesículas en las que la membrana plasmática perdió la simetría y exponen fosfolípidos con carga negativa sobre su superficie, principalmente fosfatidilserina.

Característica	Exosomas	Micropartículas	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	50-100 nm	100-1000 nm	Hasta 4000 nm
Origen	Multivesicular Compartimentos internos	Vesiculación membrana plasmática	Fragmentos celulares
Liberación	Constitutiva y/o activación	Activación y/o inicio apoptosis	Final apoptosis
Capacidad de unión a AnV	Nula o baja	Alta	Alta

Figura 3. Características de los diferentes tipos de vesículas extracelulares. Modificado de Sánchez-López 2017.

Fueron descritas por primera vez en 1967 por Wolf, en donde se consideraba que eran desechos celulares sin actividad biológica. Sin embargo, hoy son reconocidas como verdaderas entidades subcelulares capaces de modular diversas funciones biológicas involucradas en el control de la homeostasis vascular, angiogénesis, inflamación, entre muchas otras. Las micropartículas guardan características de las células de las cuales provienen y dependiendo de la información que transporten, pueden favorecer la trombosis (por el FT), la fibrinólisis (por u-PA, t-PA, u-PAR) u

otra función biológica (Figura 4) (Dignat & Boulanger et al. 2011).

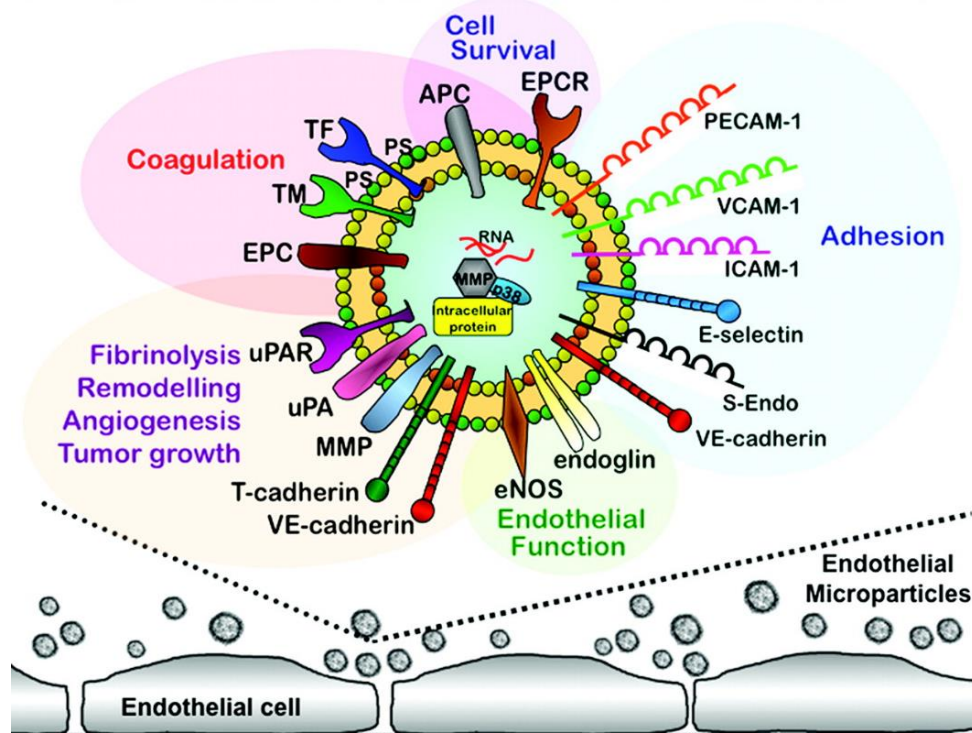


Figura 4. Representación esquemática de la información (u-PA, u-PAR) que transporta una micropartícula circulante y su asociación con diversos efectos biológicos (fibrinolisis). Modificado de Dignat & Boulanger et al. 2011

Diversas investigaciones muestran que las MPs derivadas de células endoteliales (EMPs) de microvasculatura humana tienen la capacidad de generar plasmina sobre su superficie, al igual que las derivadas de leucocitos (LMPs). Esta evidencia sugiere que existe un mecanismo que permite la formación de plasmina a nivel molecular. Las MPs que expresan u-PA participan en este mecanismo de intercomunicación proteolítica y son capaces de activar eficientemente la unión del plasminógeno al fibrinógeno, fibrina y matrices extracelulares. Lo que sugiere que los MPs participan de manera importante en la fibrinolisis.

3.1. ¿Cómo estudiar la coagulación?

Existen 3 modelos descritos para el estudio de la coagulación: el modelo clásico, descrito por Morawitz, conocido como el padre de la coagulación en 1904; quien admitió que los tejidos vasculares liberan una tromboplastina tisular necesaria para iniciar el proceso de coagulación. La cascada de coagulación: descrita en la década de los 60's propuesta como un modelo enzimático a través de dos vías distintas: la vía intrínseca y la vía extrínseca. Sin embargo, es importante mencionar que no debería hablarse de cascada de coagulación, sino más bien de una serie de cambios enzimáticos y bioquímicos para la formación de trombina y subsecuentemente la formación de un coagulo de fibrina, sin dividir el sistema en vías separadas, ya que todos los factores interactúan entre sí para un correcto funcionamiento. Y finalmente el modelo celular: este último punto fundamental en el desarrollo de este estudio; en el cual se describe que las superficies celulares constituyen el ambiente natural donde se desarrollan las reacciones de coagulación, donde las plaquetas son las que aportan la superficie más eficiente para la generación de trombina, sin embargo, carecen de FT (Martínez-Murillo, 2006; Furie & Furie, 1992).

En la actualidad existen importantes conceptos sobre la iniciación de la coagulación, entre ellos:

1) El FT junto con el factor VIIa (FT-FVIIa) son los iniciadores. 2) La activación del factor IX se genera por el complejo FT-FVIIa y 3) La importancia de los factores VIII y IX para sostener la coagulación y producir grandes cantidades de trombina sobre la superficie de las plaquetas para convertir el fibrinógeno en fibrina. El plasminógeno (PLG) es una proenzima sintetizada en el hígado, organizada en 7

dominios estructurales: el péptido pre-activador, cinco zonas homólogas de bucle triple llamadas “kringles” y un dominio proteinasa. El kringle 1 y 4 muestran sitios de alta afinidad por residuos de lisina. Estos dominios median interacciones específicas con la fibrina. De esta forma en presencia de fibrina el t-PA y el PLG se unen a esta a través de residuos Lys (en la región C terminal) presentes en la fibrina; lo que permite la conversión de PLG en plasmina para llevar a cabo la fibrinólisis (Figura 1). (Martínez-Murillo, 2006).

Por otro lado, el daño endotelial que caracteriza al paciente infartado inicia un proceso de apoptosis celular a partir del cual se liberan MPs provenientes de cualquier célula. Generándose a la par una respuesta inflamatoria caracterizada por la liberación de citocinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión, en donde es importante recalcar que este proceso puede condicionarle al paciente un estado hipofibrinolítico al resultar favorecida la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Finalmente, la expresión de FT en la superficie celular condicionado por el sistema de coagulación debido al daño endotelial favorece la expresión de fosfolípidos de carga negativa, así como activadores del plasminógeno junto con sus receptores en la superficie de las MPs para llevar a cabo la función fibrinolítica (Furie & Furie, 1992).

También es importante mencionar que las MPs representan una vía de comunicación directa entre diversas células en la circulación sanguínea (tipo autocrina, paracrina y endocrina). Es decir, constituyen un mecanismo que describe la posibilidad de una comunicación célula a célula, tienen la capacidad de secuestrar a los componentes de la membrana y citoplasma de las células de las que derivan, así como las proteínas e información genética (RNA mensajero,

miRNAs, etc), pueden provocar diferentes respuestas en las células próximas o remotas con las que interactúan y por lo tanto actúan como macro mensajeros intercelulares. Los mecanismos de biogénesis y la liberación de las MPs que se proponen incluyen la redistribución de los componentes de la membrana, con la pérdida de la estructura del citoesqueleto, la formación de nano dominios y la presencia de fosfolípidos aniónicos que actúan como fuerzas de atracción en la membrana (Schara et al. 2009).

Las MPs ingresan a las células diana y comparten la información, proteínas intracelulares, segundos mensajeros y material genético. Los datos sobre la presencia de miRNAs en micropartículas liberadas por células de músculo liso vascular (VSMC) y en particular de las células de músculo liso de arteria coronaria humana (HCASMC) lo hacen relevante por su posible potencial como biomarcadores. Al facilitar la transferencia horizontal de moléculas bioactivas, se propone que tienen un rol vital en la invasión tumoral, las metástasis, la coagulación y la inflamación. También se conoce su función fisiológica que genera un microambiente en el árbol vascular que mantiene una adecuada homeostasis en las funciones procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticas. Aunque inicialmente se reconocía solamente sus propiedades procoagulantes, actualmente se contemplan como un sistema que puede aportar un balance procoagulante/fibrinolítico en el que participan de manera sobresaliente las MPs que surgen a partir de células endoteliales o que inciden en el endotelio vascular, lo que conserva la homeostasis celular y protege a las células endoteliales de la lisis que induce el complejo del complemento C5b-9 de la caspasa-3 y de los fosfolípidos oxidados. (de Gonzalo-Calvo et al, 2016; Sims & Wiedmer, 1995;

Diamant et al. 2008; Lacroix et al. 2007).

El endotelio tiene múltiples funciones: antiinflamatoria, anticoagulante, regula el tono y la permeabilidad vascular. Varias de sus acciones están vinculadas a la generación de óxido nítrico (NO) o de la enzima que participa en su síntesis eNOS (por sus siglas en inglés nitric oxide synthase derived of endothelium). Las MPs incrementan la producción de NO y disminuyen las especies reactivas de oxígeno que en general tienen características oxidantes y deletéreas para el endotelio (Mostefai HA et al. 2008). Así mismo, las células endoteliales garantizan la apropiada actividad fibrinolítica. La fibrinólisis se caracteriza por reacciones enzimáticas que generan plasmina a partir del PLG y sus principales activadores. Dicha enzima proteolítica elimina, entre otros sustratos la fibrina que se deposita en los vasos sanguíneos y borra el recuerdo de todos los procesos coagulantes, lo que devuelve al endotelio vascular todas sus funciones fisiológicas. El proceso se lleva a cabo sobre una superficie sólida, en donde la fibrina presenta sitios de alta afinidad para el PLG (precursor de la plasmina). El plasminógeno que se une a estos sitios es sustrato del t-PA para generar plasmina, que incrementa la eficiencia catalítica al exponer nuevos sitios de afinidad, lo que expande el mecanismo. De manera relevante surge el concepto de que las MPs que provienen de las células endoteliales, bajo el efecto del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), proporcionan también una superficie capaz de interactuar con el plasminógeno y permitir así su conversión en plasmina circulante, a través del u-PA y su receptor (uPAR). Esta capacidad de las micropartículas para generar plasmina (Figura 2) les otorga una función profibrinolítica relevante en la migración celular, la angiogénesis, la difusión de las células malignas y la apoptosis (Lacroix et al. 2012;

Doeuvre et al .2009).

3.2. Micropartículas y su relación con enfermedades crónico-degenerativas.

Un ejemplo del papel dual de las MPs lo aporta el hecho de que aquellas que provienen de las células endoteliales se incrementen en los pacientes con aterosclerosis subclínica y no así en los pacientes con aterosclerosis sintomática, sugiere que las MPs tienen un papel protector bajo algunas circunstancias fisiopatológicas. Se dice que las micropartículas endoteliales y de leucocitos, que llevan respectivamente el activador del plasminógeno tisular o el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa, apoyan una parte de la actividad fibrinolítica en la circulación que se modula en entornos patológicos. El conocimiento de esta actividad fibrinolítica transmitida por micropartículas proporciona una visión más completa del papel de estas en el equilibrio hemostático (Lacroix et al. 2012).

Es importante mencionar que en los procesos inflamatorios las MPs que provienen de los leucocitos son capaces de inducir la expresión de genes que incrementan la producción de citocinas y moléculas de adhesión, en cultivos *in vitro* de células endoteliales y leucocitos, pero también en este terreno se observa un doble papel ya que una subpoblación de MPs que provienen de los leucocitos y polimorfonucleares con presencia de anexina-1 les proporciona una actividad antiinflamatoria (Dalli et al.2008).

Aun cuando hasta el momento su estudio se ha centrado en esclarecer su presencia en diferentes patologías, se debe resaltar que también se encuentran presentes en individuos sanos a una concentración mayor de 1×10^9 mg/ml, lo que podría sugerir que las MPs tienen un papel relevante en la conservación de la

integridad del organismo, la homeostasis celular y/o promoviendo mecanismos de defensa (Arroyo et al 2019).

Las micropartículas circulantes contribuyen a la patogénesis de aterotrombosis y se encuentran elevadas en enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus. Es por eso por lo que resultan de utilidad como un biomarcador para valorar el control metabólico (Chen et al. 2018).

Algunos autores identifican características diferentes entre las MPs de individuos con angina estable o con infarto agudo de miocardio. Se ha llegado a plantear también que su presencia contribuye a la magnitud del episodio por su capacidad de diseminar estímulos procoagulantes e inflamatorios. Sin embargo, también pueden favorecer un estado profibrinolítico que permita la reperfusión espontánea de la arteria coronaria como ocurre en el 15-20 % de los infartos al miocardio con elevación del segmento ST. La mayoría de las investigaciones han centrado su visión en la búsqueda de su actividad procoagulante, como factor de riesgo trombótico, en diversas situaciones clínicas. Sin embargo, al considerar su actividad profibrinolítica, su presencia es muy importante también tanto en la génesis como en el desenlace de las enfermedades cardiovasculares. Las micropartículas derivadas de plaquetas son el subtipo más abundante medido en el plasma humano; pueden mediar múltiples respuestas celulares, afectando predominantemente el metabolismo de proteínas y lípidos, así como coagulación e inflamación. Las micropartículas derivadas de células endoteliales son un marcador biológico de daño endotelial y de alteraciones en el tono vascular, que también pueden jugar un rol en la reparación endotelial, como aquellas que se derivan de procesos de activación celular, ya que muestran propiedades proangiogénicas y

cardioprotectoras. En contraste con las EMPs generadas de procesos apoptóticos que son consideradas marcadores de daño endotelial y envejecimiento vascular (Bernal-Mizrachi et al. 2003; Bernal-Mizrachi et al. 2004; Plawinski & Angles-Cano. 2013).

Por otro lado, el PAI1 es una enzima inhibidora de la activación del plasminógeno y su incremento se relaciona con una actividad fibrinolítica disminuida, llevando a la acumulación de fibrina en las membranas celulares y en el intersticio de los tejidos. Investigaciones recientes mencionan que los factores asociados al síndrome metabólico, como: aumento de la presión sistólica, dislipidemia y lipoproteínas de baja densidad (LDL) aumentada, es una condición para concentraciones elevadas de PAI 1 en el plasma, lo que ocasiona una disfunción fibrinolítica que incrementa el riesgo para una trombosis arterial y como consecuencia una enfermedad cardiovascular. La concentración de MPs en un grupo de pacientes con factores de riesgo asociados al síndrome metabólico, que no se encontraban en ningún tratamiento farmacológico (caso) se encontraron concentraciones elevadas de MPs de plaquetas (PMPs) ($p < 0.001$) y EMPs ($p < 0.003$) comparado con un grupo de personas libres de factores de riesgo (control). Por lo tanto, las MPs pueden considerarse como posibles biomarcadores para la identificación de sujetos con síndrome metabólico en riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares o diabetes mellitus tipo 2, ya que también se ha observado que los niveles altos de glucosa se asocian con MPs circulantes elevadas (Zahran et al. 2019).

Además, la modulación de los niveles de MPs a través de terapias farmacológicas como en el caso de los antihipertensivos, pueden llegar a disminuir el riesgo que

estas confieren, al disminuir los niveles en plasma. Recalcando la importancia de que las MPs son capaces de unirse a las células circulantes o al endotelio y participar en la comunicación intercelular a través de una amplia variedad de vías para transmitir información sobre inflamación, activación celular, apoptosis, función endotelial, remodelado vascular y angiogénesis con lo que aceleran la progresión de las ECV. En consecuencia, las estrategias para reducir las MPs circulantes pueden retardar las complicaciones CV. (Chen et al. 2018).

La diabetes mellitus induce estrés metabólico a las células vasculares, lo cual promueve la activación plaquetaria y la disfunción vascular. El grado de activación de las células vasculares se puede medir con el número y el fenotipo de las MPs circulantes. En el caso de los pacientes con DM1 presentan el doble de MPs circulantes derivadas de plaquetas y monocitos, positivas para FT, en comparación con los pacientes que presentan DM2. Lo cual posiblemente refleje es estrés metabólico crónico de larga evolución. El uso de ácido acetil salicílico (AAS) en la prevención primaria de pacientes diabéticos en tratamiento farmacológico de acuerdo con las guías de práctica clínica no influye en la liberación de MPs derivadas de plaquetas, es decir no presentan ningún efecto sobre ellas, así como de células endoteliales. Sin embargo, es importante mencionar que si reducen la liberación de las MPs derivadas de leucocitos, monocitos y células de músculo liso en los pacientes diabéticos que aún no han presentado un evento cardiovascular. El efecto del AAS en la DM1 y DM2 son similares, a pesar de que cada una presenta un perfil de liberación distinto (Chiva-Blanch et al. 2016).

Diversos trabajos de investigación se han encargado de analizar la asociación de la actividad de las MPs con algunos fármacos, como, por ejemplo: estatinas, calcio-

antagonistas, hipolipemiantes, ácido acetilsalicílico, etc. Sin embargo, el comportamiento que pueden llegar a presentar en presencia de hipoglucemiantes orales no está claramente establecido. En el caso de los pacientes diabéticos que reciben estatinas por sus efectos pleiotrópicos independientemente de disminuir la concentración lipídica, como antiinflamatorios del endotelio y propiedades antitrombóticas, pueden influenciar en los marcadores de la coagulación y activación plaquetaria, disminuyendo la mortalidad cardiovascular en este grupo de pacientes con o sin historia de enfermedad cardiovascular. Ya que disminuyen tanto la actividad plaquetaria como la expresión de los inhibidores del plasminógeno y aumentan la expresión del tPA (Echeverri et al. 2005).

Por ejemplo, en un estudio evaluaron el uso de simvastatina en monoterapia y combinada con ezetimiba. En donde compararon los niveles de MPs en pacientes diabéticos con enfermedad renal crónica (DM+ERC) y sin enfermedad renal (DM), reportando lo siguiente: en el grupo de pacientes DM+ERC la monoterapia con simvastatina redujo significativamente los niveles de MPs, así como de MPs derivadas de plaquetas ($p < 0.001$) y la expresión de FT en la superficie. Lo que se traduce en una disminución de la actividad procoagulante. Cuando se aplicó la terapia dual simvastatina+ ezetimiba en este grupo no se obtuvieron diferencias en estos parámetros, sin embargo, esta combinación mostró una disminución de las MPs derivadas de plaquetas en el grupo de pacientes DM sin ERC (Almquist et al. 2016).

Es importante mencionar que el uso de atorvastatina reduce la expresión de FT en los pacientes con trombosis arterial periférica y en pacientes con DM1 (Mobarrez et al. 2011).

Las MPs se encuentran elevadas en pacientes que presentan enfermedades crónico- degenerativas, como: DM1, DM2, ERC, ECV por mencionar algunas, sin embargo, el grado de elevación de estas es proporcional a las enfermedades asociadas, es decir a mayor número de enfermedades en un individuo, mayor número de MPs. Así como del tiempo de evolución y control de esta. Ya que son resultado final de un proceso inflamatorio en el organismo que nos hablan de activación o apoptosis celular (Chiva-Blanch et al. 2016; Almquist et al. 2016; Mobarrez et al. 2011).

Dado que la prevalencia de la diabetes mellitus está aumentando en todo mundo, se ha estimado que en 2030 habrá aproximadamente 552 millones de personas con DM, de las que más de un 95 % tendrán DM tipo 2. (Chiva-Blanch et al. 2016). Circunstancia por la cual radica la importancia de buscar una asociación entre la actividad de las micropartículas circulantes con hipoglucemiantes orales, ya que de acuerdo con las guías de práctica clínica son el tratamiento de primera línea para dicha enfermedad.

En este sentido, el proyecto FIMICOR (Fibrinolytic Microparticles: protein, functional and mRNA evaluation in acute CORonary síndromes) plantea una estrategia de estudio original al analizar el potencial fibrinolítico de las micropartículas obtenidas de una muestra sanguínea. La técnica de ultracentrifugación es un método reportado en la literatura para la obtención/extracción de micropartículas con indicaciones especiales que la diferencian del resto de las vesículas extracelulares. Este el método empleado en este trabajo de investigación. Es importante mencionar que no existe un método de separación óptimo, por eso es importante tomar en cuenta la metodología y la

pregunta de investigación para determinar el método de extracción. La técnica de ultracentrifugación ofrece una extracción y sensibilidad intermedia, en la cual primero se eliminan las células, posteriormente restos celulares, hasta obtener plasma libre de células sanguíneas. Asimismo, la técnica de generación de plasmina determinó la capacidad de estas para formar plasmina y de tal manera corroborar la integridad del sistema de coagulación a nivel molecular en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas, presenta la ventaja de que nos permite tener un análisis molecular sobre el estado real del paciente relacionándolo con escenarios clínicos, como: aumento en el riesgo cardiovascular o formación de trombos. Es una técnica altamente especializada, costosa, que requiere de mucho tiempo para obtención de resultados, se requiere un procedimiento altamente estandarizado, por lo que de momento no es un método que pueda implementarse por cualquier profesional de la salud o se lleve a cabo como un estudio de rutina. (Théry et al. 2018; Zaborowski et al. 2015).

Nuestro grupo de investigación se distingue por ser un equipo multidisciplinario que tiene como principal objetivo el estudio de las enfermedades cardiovasculares bajo diferentes perspectivas de trabajo.

4. Planteamiento del problema.

Las enfermedades cardiovasculares, así como la diabetes mellitus tipo 2 engloban la principal causa de morbi-mortalidad en todo el mundo. Además, los resultados de diversas investigaciones indican que la actividad profibrinolítica de las MPs es muy importante tanto en la génesis y en el desenlace de dichas enfermedades.

Estos antecedentes sugieren un escenario, en el que las MPs podrían ser un

biomarcador valioso de diagnóstico y desarrollo de nuevos ensayos para identificar una adecuada respuesta terapéutica. Sin embargo, el comportamiento que pueden llegar a presentar en presencia de hipoglucemiantes orales no está claramente establecido, a pesar de los avances en terapia farmacológica para los pacientes diabéticos los hipoglucemiantes orales como la metformina continúan siendo terapia de base para los pacientes con DM2.

5. Pregunta de investigación.

¿Cuál es la diferencia en la actividad fibrinolítica de las micropartículas en pacientes con infartoagudo de miocardio con elevación del segmento ST diabéticos tipo 2, en tratamiento con hipoglucemiantes orales, contra aquellos en tratamiento con estatinas?.

6. Justificación.

Las enfermedades cardiovasculares hoy en día se encuentran dentro del marco de las principales causas de mortalidad. A su vez presentan amplias complicaciones en el lecho vascular, tales como: trombosis, infarto, isquemia, entre otras.

En diversos estudios se ha demostrado la descripción y la utilidad de las micropartículas dentro de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas, haciendo énfasis en su función procoagulante y su relación con el número de MPs que se presentan en el organismo humano en el momento del diagnóstico, sin embargo, el estudio de la actividad fibrinolítica que estas presentan en estos pacientes aún se encuentra limitado. Dejándonos en incógnita mediante que mecanismo o factores participan en la vía fibrinolítica, así como las asociaciones

que favorecen o alteran dicha función, sin olvidar mencionar que no está clara la participación de las micropartículas en presencia de hipoglucemiantes orales.

7. Hipótesis.

Las micropartículas de pacientes diabéticos tipo 2 con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, en tratamiento con hipoglucemiantes orales, presentan actividad fibrinolítica disminuida, en comparación al grupo tratado con estatinas.

8. Objetivo general.

Comparar la diferencia de la actividad fibrinolítica de las micropartículas en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, diabéticos tipo 2, en tratamiento con hipoglucemiantes orales y en aquellos tratados con estatinas.

9. Objetivos particulares.

- Determinar la relación entre la dosis de los medicamentos de interés con la concentración de MPs.
- Determinar la relación entre la dosis de los medicamentos de interés con la modulación de la actividad fibrinolítica de las MPs.
- Determinar la actividad fibrinolítica de las micropartículas en ambos grupos de estudio.

10. Metodología.

10.1. Diseño del estudio.

Estudio observacional, retrospectivo, transversal, comparativo, analítico (Caso y no caso).

10.2. Cálculo de tamaño de muestra:

(Pita-Fernández, 1996).

$$n = \frac{(Z_{\alpha}^2)(S^2)}{i^2}$$

Donde:

- n = Número de sujetos necesarios para el estudio
- Z_{α} = Valor de Z correspondiente al riesgo de α deseado
= Con una confianza de 95 % ($1 - \alpha = 0.095$; $\alpha = 0.05$) = 1.96
- S = Varianza de la variable cualitativa que se supone existe en una población
- i = Nivel de precisión o error máximo = 20 %

Se realizó el cálculo de tamaño de muestra considerando los resultados de un trabajo previo (Lacroix et al. 2012), donde midieron la actividad de la plasmina mediante la misma técnica: con $S = 0.55$ y $i = 0.2$; $n = 29.1$, si consideramos 20 % de pérdidas (5.9), $n = 35$ para cada grupo de estudio.

Estos individuos se reclutaron consecutivamente de acuerdo con su ingreso al Departamento de Hemodinámica, para una intervención coronaria percutánea en el Instituto Nacional de Cardiología, siempre y cuando hubiesen cumplido con los criterios de inclusión. Además de haber firmado el consentimiento informado.

10.3. Criterios de inclusión en el estudio.

CASO:

- Se ingresaron pacientes (tanto hombres como mujeres), mayores de 18 años, con diagnóstico de infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (realizado por un médico cardiólogo del INC), que sea sometido a un estudio angiográfico, en el Departamento de Hemodinámica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
- Pacientes con infarto agudo de miocardio, que cuenten con el diagnóstico establecido de diabetes mellitus tipo 2, en tratamiento previo de al menos 3 meses con hipoglucemiantes orales (metformina y glibenclamida).
- Acepten participar en el estudio, previo consentimiento informado.

NO CASO:

- Se ingresaron pacientes (tanto hombres como mujeres), mayores de 18 años, con diagnóstico de infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (realizado por un médico cardiólogo del INC), que sean sometidos a un estudio angiográfico, en el Departamento de Hemodinámica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
- Pacientes con infarto agudo de miocardio, que se encuentren en tratamiento médico previo al menos 3 meses con estatinas por diagnóstico de dislipidemia o por riesgo cardiovascular.
- Acepten participar en el estudio, previo consentimiento informado.

*Para finalidad de interpretación de resultados el grupo de casos se identificó

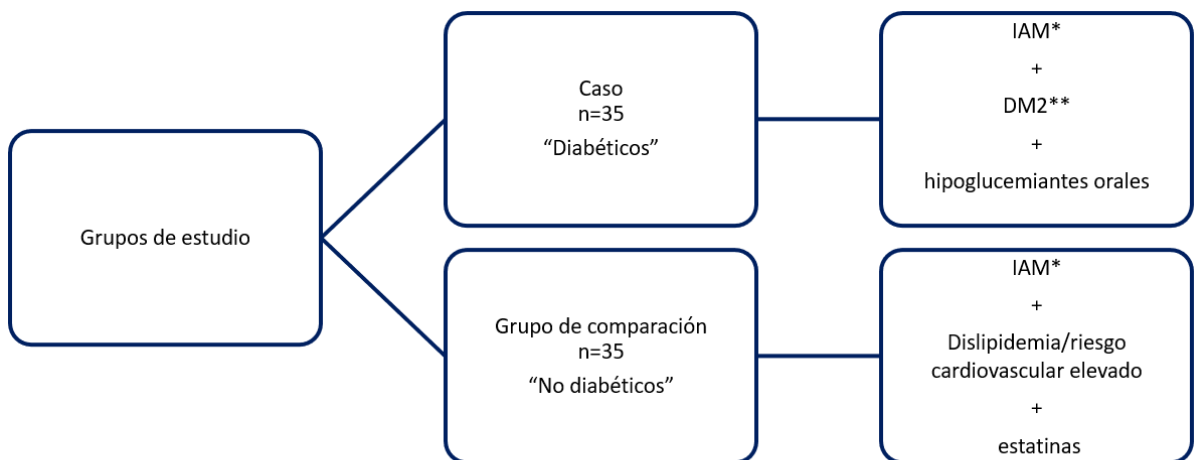
como diabéticos y el grupo comparativo como como no diabéticos. Gráfica 1.

10.4. Criterios de exclusión en el estudio.

- Pacientes diabéticos que no se encuentren en tratamiento farmacológico.
- Pacientes diabéticos que se encuentren en tratamiento con hipoglucemiantes orales diferentes a metformina y glibenclamida.
- Pacientes diabéticos en tratamiento con insulina.
- Pacientes que consuman metformina y glibenclamida con indicación distinta a diabetes mellitus.
- Pacientes con padecimientos: autoinmunes, hepáticos, renales y/o cáncer.

10.5. Criterios de eliminación en el estudio.

- Perdidas de muestra por cualquier causa.
- Pacientes que decidan retirar su muestra del estudio.



*IAM: Infarto agudo de miocardio.
**DM2: diabetes mellitus tipo 2.

Gráfica 1. Diagrama de flujo de los grupos de estudio; caso y grupo comparativo.

10. 6. Descripción operativa.

Se revisó la programación diaria del área de Hemodinámica INC para ubicar los estudios de intervención coronaria percutánea y se eligieron a los pacientes con cardiopatía isquémica que cumplieron con los criterios de inclusión ya mencionados previamente. También se obtuvo muestra sanguínea de los pacientes que provengan de la Unidad Coronaria (cuando esto sea posible), aun cuando la intervención coronaria percutánea no sea programada, es decir, se obtuvo muestra sanguínea de un paciente que llega directo al área de urgencias de dicha Institución. Cada paciente, o un familiar responsable, autorizó (mediante consentimiento informado) la participación en el estudio angiográfico, la toma de una muestra sanguínea y así como el uso de la muestra sanguínea para métodos de investigación. Se revisaron los expedientes y se recolectaron los datos relevantes para el estudio.

10. 7. Variables de estudio.

Tabla 1. Definición operacional de las variables de estudio.

Variable conceptual	Definiciones	Unidad de medida	Tipo de variable
Hipoglucemiante	Operacional: Fármacos que de acuerdo con su mecanismo de acción se utilizan para el tratamiento de la DM2 y corresponden al grupo de sensibilizadores y secretagogos de insulina. Tomado del expediente clínico.	Metformina/ Glibenclamida	Cualitativa dicotómica

Tiempo de evolución de DM2	Operacional: Periodo de tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad, tomado del expediente clínico.	<10 años >10 años	Cualitativa nominal
Actividad fibrinolítica	Operacional: Medida a través de la generación de plasmina; técnica electroforética que permite cuantificar la presencia de plasmina en base a un sustrato cromogénico.	µg/ml	Cuantitativa continua
Edad	Operacional: Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo expresado en años al momento del diagnóstico, dato que se tomará del expediente clínico.	años	Cuantitativa discreta
Sexo	Operacional: Clasificación en hombre o mujer de acuerdo con las características fenotípicas y anatómicas, dato que se tomará del expediente clínico.	Masculino /femenino	Cualitativa dicotómica
Dislipidemia	Operacional: Enfermedad asintomática, causada por concentraciones anormales del perfil lipídico (colesterol >200mg/dl, LDL >100 mg/dl, HDL <45 mg/dl, triglicéridos >150 mg/dl). Dato tomado del expediente clínico.	Si/no	Cualitativa dicotómica
Dosis/ día metformina	Operacional: Dosis total de metformina que recibe el paciente en un lapso de 24 horas. Dato extraído del expediente clínico.	500 mg 850 mg 1700 mg 2500 mg	Cuantitativa Discreta
Dosis/día glibenclamida	Operacional: Dosis total de glibenclamida que recibe el paciente en un lapso de 24 horas. Dato extraído del expediente clínico.	5 mg 10 mg 15 mg	Cuantitativa discreta

<p>Concentración de proteína de micropartículas (MPs)</p>	<p>Operacional: Concentración proteica de las MPs obtenidas por ultracentrifugación y medidas a través de espectrofotometría. Dato obtenido a través del proceso experimental.</p>	<p>µg/ml</p>	<p>Cuantitativa continua</p>
<p>Actividad fibrinolítica</p>	<p>Operacional: Medida a través de la generación de plasmina; técnica electroforética que permite cuantificar la presencia de plasmina en base a un sustrato cromogénico.</p>	<p>µg/ml</p>	<p>Cuantitativa continua</p>

10. 8. Variables de confusión.

(Sin estar enlistados por orden de importancia).

- Hipertensión arterial sistémica: pacientes con diagnóstico previo o con tratamiento antihipertensivo establecido, o pacientes con TA sistólica ≥ 140 mmHg, diastólica ≥ 90 mmHg en 2 o más registros en días diferentes.
- Hipertrigliceridemia: diagnóstico previo, tratamiento con fibratos o triglicéridos séricos ≥ 150 mg/dL.
- Obesidad: índice de masa corporal ≥ 30 . Medición de cintura > 90 cm en la mujer o 102 cm en el hombre.

11. Material, métodos y procedimientos.

11. 1. Obtención de muestra de sangre.

Se obtuvo de cada paciente, con al menos 4 h de ayuno, una muestra de 13.5 mL de sangre por punción venosa. La muestra de sangre se colocó en tubos con citrato de sodio (0.109 mM) como anticoagulante, en una relación 1:10.

11.2. Extracción de micropartículas.

Las micropartículas se obtuvieron mediante la técnica de ultracentrifugación. Brevemente, la sangre colectada se sometió a una doble centrifugación (1500 x g por 15 min y 13,000 x g por 5 min; a temperatura ambiente) para obtener plasma libre de células sanguíneas. Posteriormente, el plasma se centrifugó a 20000 x g por 90 min a 4 °C y se realizan dos lavados más con el amortiguador HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM; pH 7.4), en las mismas condiciones (Figura 5). Las

muestras se guardaron en el mismo amortiguador, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. (Doeuvre 2009; Théry et al. 2018; Zaborowski et al. 2015).

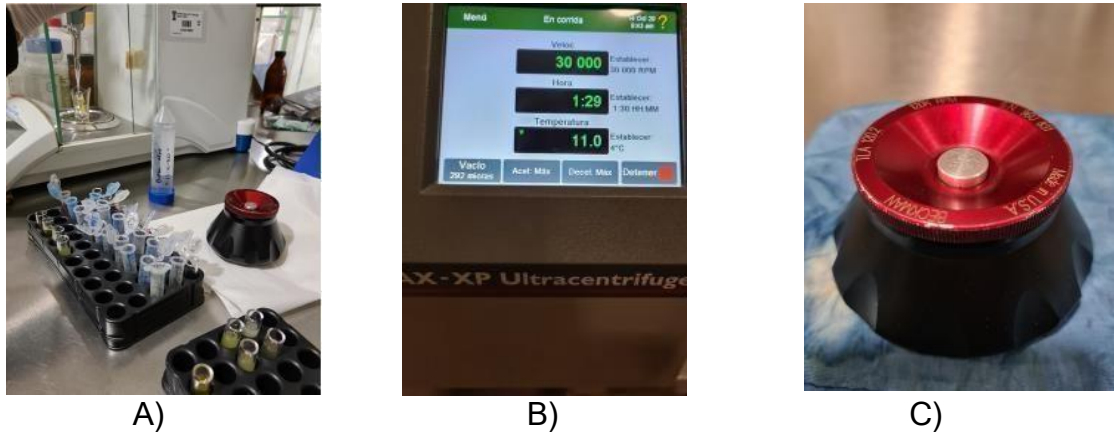


Figura 5. Imágenes representativas de cómo se realiza el proceso de obtención de MPs. A) Foto del procesamiento de muestras previo a la centrifugación diferencial (se colocaron las muestras en tubos de policarbonato, se pesaron y se colocaron a contrapeso en el rotor); B) Fotos de ultracentrifuga ÓPTIMA BECKMAN y C) rotor TLA 1002; empleados para la extracción de MPs.

11.3. Cuantificación de proteína de las micropartículas.

Las micropartículas obtenidas se sometieron a 5 ciclos (de 1 min) de congelación y descongelación (nitrógeno líquido a $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ - baño maría a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), para lisar su membrana y poder estimar el contenido de proteínas mediante un espectrofotómetro (modelo Eon, marca BioTek) a 280 nm.

El volumen de MPs a cuantificar fue de $7.5\text{ }\mu\text{L}$ por muestra, previo a cada cuantificación las micropartículas se depositaban en tubos eppendorf de 0.5 mL, sin embargo, al iniciar este proceso fueron colocadas en el vortex con duración de 3 segundos, para posteriormente depositar $2.5\text{ }\mu\text{L}$ de MPs en cada pozo. La placa del espectrofotómetro se compone de 16 pozos, en los cuales se generó lectura triplicada por muestra, para obtener el promedio de proteínas de cada una de ellas.

Estas fueron almacenadas en tubos eppendorf de 0.5 mL bajo congelación a -19°C . Hasta su próxima utilización de ser necesario.

11.4. Actividad fibrinolítica.

Se determinó la presencia del activador del plasminógeno, el t-PA, mediante la técnica de generación de plasmina (Lacroix et al. 2007). Técnica que nos permitió cuantificar la presencia de plasmina que se deriva de las MPs con base en un sustrato cromogénico, para la determinación de la actividad fibrinolítica de las MPs, es decir corroborar la capacidad que presentan o no para degradar depósitos de fibrina. La cual se llevó a cabo de la siguiente manera: En una placa de 384 pozos (Greiner Bio-One 788876) se depositó por duplicado para cada muestra, en un volumen final de $25\ \mu\text{L}$, t-PA ($0.2\text{-}0.00002\ \text{UI/mL}$) o 2×10^5 MPs en suspensión en amortiguador PBS, suplementado con albúmina bovina $2\ \text{mg/mL}$, plasminógeno $1\ \mu\text{M}$ (Plasminogen HYPHEN BIOMED), sustrato cromogénico selectivo para la plasmina $0.75\ \text{mM}$ ((metil-malonil)-hidroxipropil arginina, p-nitroanilina (CBS S0065, Stago, Francia)). La cinética se siguió durante 24 h en un espectrofotómetro (Eon, BioTek), midiendo el cambio de absorbancia a $405\ \text{nM}$ por la producción de p-nitroanilina que genera el cromógeno al liberarse del péptido por acción de la plasmina.

Se graficaron los resultados obtenidos de la curva patrón de t-PA y los resultados obtenidos de las muestras de MPs se interpolan en dicha curva (Gráfica 1).

12. Análisis estadístico.

Se determinó la distribución de las variables cuantitativas mediante la prueba de Shapiro Wilks, los datos se presentan con medidas de tendencia central con su respectiva medida de dispersión, dependiendo de su distribución (promedio \pm DE o mediana (rango intercuartílico), para resultados paramétricos y no paramétricos, respectivamente).

Las variables cualitativas se presentan como frecuencia y porcentaje (n (%)).

Se determinó si existen diferencias entre grupos mediante las pruebas de t-student, U Mann-Whitney o Wilcoxon, dependiendo de la distribución de los datos.

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrada para establecer la asociación entre variables categóricas.

Con $*p < 0.05$, el resultado se consideró estadísticamente significativo. El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS versión 26.0 (IBM, Amonk, NY, EE. UU.).

13. Consideraciones éticas.

El proyecto fue aprobado (No. 18-1043) por el Comité de Ética y de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, que vigilará estrechamente que el proyecto cumpla con lo previsto por la Ley General de Salud. Además, las muestras se tomaron siguiendo los lineamientos de la Declaración del Helsinki causando el menor daño posible.

14. Consideraciones de bioseguridad.

-Riesgos tóxicos: El paciente no fue sometido a ningún tipo de exposición de riesgo tóxico dentro del protocolo de investigación. La muestra sanguínea obtenida de cada paciente se procesó para la obtención de micropartículas, con la técnica mencionada previamente.

-Riesgos infectocontagiosos: Para disminuir el riesgo de punción o infectocontagiosos que implicó la obtención de cada muestra sanguínea, se extrajo con la colocación de guantes estériles, jeringa y aguja nueva y posteriormente depositada en tubos citratados, únicamente manipulable por el médico encargado. La generación de RPBI: se colocaron dentro de botes rojos (identificadas específicamente para este tipo de residuos), las cuales se encuentran dentro del área de trabajo en donde se llevó a cabo el protocolo de investigación. Como corresponde de acuerdo con la NOM-087-SSA1-2002.

No se trabajó con microorganismos, ni se llevaron a cabo modificaciones genéticas.

-Riesgos radiológicos: La intervención coronaria percutánea (ICP) por si sola implica una exposición radiológica para el paciente, sin embargo, es responsabilidad del médico tratante mencionarlo al paciente. Por parte del investigador no existe riesgo radiológico, ya que la muestra se tomó previo al inicio de la intervención. Durante el procesamiento de muestrassanguíneas para la obtención de micropartículas, no existió ningún riesgo radiológico.

15. Resultados.

Tabla 2. Características sociodemográficas y factores de riesgo cardiovascular de los pacientes.

La dislipidemia resultó estadísticamente significativa en el grupo de pacientes no diabéticos. El resto, 37.1 % correspondía a pacientes con riesgo cardiovascular elevado. El tabaquismo resultó un factor de riesgo estadísticamente significativo en el grupo de no diabéticos.

Variable	Diabéticos (n = 51)	No diabéticos (n = 27)
Edad (años) ^Φ	59.4 ± 10.3	60.9 ± 10.6
Sexo (n (%))	Mujer: 10 (19.6) Hombre: 41 (80.4)	Mujer: 4 (14.8) Hombre: 23 (85.2)
IMC (Kg/m²) ^Φ	27.0 ± 3.3	29.1 ± 7.9
Factores de riesgo cardiovascular (n (%))		
Hipertensión arterial	Si: 35 (68.6) No: 16 (32.4)	Si: 18 (66.7) No: 9 (33.3)
Tabaquismo pasado	Si: 30 (58.8) No: 21 (41.2)	Si: 24 (88.9) * No: 3 (11.1)
Tabaquismo activo	Si: 15 (29.4) No: 36 (70.6)	Si: 12 (44.4) No: 15 (55.6)
Dislipidemia	Si: 15 (29.4) No: 36 (70.6)	Si: 17 (62.9) * No: 10 (37.1)

IMC = Índice de masa corporal. Todas las variables se muestran como promedio ±

DE ϕ o n (%), dependiendo del tipo y la distribución de los datos. *p < 0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Shapiro Wilks, t-student y Chi cuadrada con el programa estadístico SPSSv26.0.

Tabla 3. Concentración de proteína de micropráctulas, en pacientes diabéticos versus no diabéticos.

La concentración de proteínas de MPs es 30 % mayor en el grupo de no diabéticos comparado con el grupo de diabéticos; 340 ug/mL y 262 ug/mL, respectivamente.

Variable	Diabéticos (n = 51)	No diabéticos (n = 27)	Diferencia (%)
Concentración de proteína de MPs (µg/mL)	262 (132 - 1161)	340 (198 - 402)	+ 30

Los resultados se muestran como mediana (rango), debido al tipo y distribución de los datos. La diferencia se obtiene al comparar los resultados de concentración de proteína de MPs de los pacientes no diabéticos respecto a los diabéticos. *p < 0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Shapiro Wilks y U de Mann Withney con el programa SPSSv26.0.

Tabla 4. Concentración de proteína de MPs en función de la frecuencia y tiempo de evolución de la diabetes mellitus tipo 2.

El 56 % de los pacientes diabéticos presentan un tiempo de evolución menor o igual a 10 años (p = 0.001) *. Conforme aumenta el tiempo de evolución de la enfermedad (diabetes mellitus) la concentración de proteína de MPs disminuye -46 %, respecto

a los primeros 10 años ($p=0.05$).

Tiempo de evolución de la DM2	n	Concentración de proteína de MPs ($\mu\text{g/mL}$)	p	Diferencia (%)
>10 años	22	260 (133 - 1312) *	< 0.05	- 46%
≤ 10 años	29*	490 (150 - 1170)		

DM2 = Diabetes mellitus tipo 2. Los resultados se muestran como mediana (rango intercuartílico), debido al tipo y distribución de los datos. * $p < 0.05$ indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Shapiro Wilks y U de Mann Whitney con el programa SPSSv26.0.

Tabla 5. Frecuencia de prescripción de los medicamentos empleados para tratar la diabetes mellitus tipo 2.

De los 51 pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, el 59 % fueron tratados únicamente en monoterapia con metformina, el 35 % fue tratado con terapia dual y solo el 6 % con monoterapia de glibenclamida.

Variable	Fármacos utilizados para tratar la diabetes tipo 2		
	Metformina	Glibenclamida	Terapia dual (metformina + glibenclamida)
n	30	3	18
%	59	6	35

Los resultados se muestran como n (%).

Tabla 6. Concentración de proteína de micropartículas de acuerdo con la dosis administrada de metformina.

No hay un patrón o comportamiento establecido sobre la concentración de proteína de MPs en plasma en los pacientes tratados con metformina.

Dosis de metformina (mg/día) (n)	Concentración de proteína de micropartículas (µg/mL)**
500 (1)	324 (90 -1177)
850 (11)	238 (166 - 365)
1000 (3)	540 (255 -1746)
1500 (2)	1014 (96 -1230)
1700 (12)	260 (150 -1010)
2500 (1)	225 (109 -1246)

Los resultados se muestran como mediana (rango intercuartílico) **, debido al tipo y distribución de los datos. *p < 0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Shapiro Wilks y U de Mann Withney con el programa estadístico SPSSv26.0.

Tabla 7. Concentración de proteína de micropartículas de acuerdo con la dosis administrada de glibenclamida.

Con dosis de 5 mg/día se modifica la concentración de proteína de manera significativa, respecto a la mediana de la población de diabéticos y respecto a las

dosis de 10 y 15 mg.

Dosis de glibenclamida (mg/día) (n)	Concentración de proteína de micropartículas (µg/mL)**
5 (1)	164 (113 - 1067) *
10 (1)	420 (96 - 1244)
15 (1)	1014 (781-2402)

Los resultados se muestran como mediana (rango intercuartílico) ** debido al tipo y distribución de los datos. *p < 0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de ShapiroWilks, Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney con el programa SPSSv26.0.

Tabla 8. Frecuencia de prescripción de estatinas.

El 85 % de los pacientes no diabéticos se encontraba en tratamiento con atorvastatina por dislipidemia o riesgo cardiovascular elevado. La estatina con mayor prescripción fue la atorvastatina.

Variable	Estatina		
	Atorvastatina	Fluvastatina	Pravastatina
n	23	1	3
%	85	4	11

Los resultados se muestran como n (%).

Tabla 9. Frecuencia y concentración de proteína de micropartículas de acuerdo con la dosis administrada de estatina.

La dosis más utilizada fue la de 40 mg/día. Las dosis de 40 mg/día y 80 mg/día disminuyeron la concentración de MPs respecto a la mediana de la población no diabética. Se observó una disminución en la concentración de MPs conforme aumenta la dosis.

Dosis de estatina (mg/día)	n (%)	Concentración de proteína de MPs (µg/ml)**
20	9 (33.3%)	409 (279 - 1260)
40	16 (59.3%)	294 (182 - 963)
80	2 (7.4%)	170(122 - 955)

Los resultados se muestran como mediana (rango intercuartílico), debido al tipo y distribución de los datos. *p < 0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Shapiro Wilks, Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney con el programa SPSSv26.0.

De las 78 muestras recolectadas (n = 51 y n = 27) y de las cuales se realizó la extracción de MPs, solo en 49 de ellas se realizó el experimento cromogénico para generación de plasmina, por lo tanto, se ejecutó un subanálisis de los 49 pacientes, debido a datos incompletos en el expediente clínico. (Diagrama 2).

Tabla 10. Características sociodemográficas y factores de riesgo cardiovascular de los pacientes.

La dislipidemia como característica clínica, resultó estadísticamente significativa en el grupo de pacientes no diabéticos. El resto, 37.1 % correspondía a pacientes con riesgo cardiovascular elevado. El tabaquismo resultó un factor de riesgo estadísticamente significativo en el grupo de no diabéticos.

Variable	Diabéticos (n = 22)	No diabéticos (n = 27)
Edad (años) ^ϕ	64.6 ± 12.7	60.9 ± 10.6
Sexo (n (%))	Mujer: 5 (22.7) Hombre: 17 (77.3)	Mujer: 4 (14.8) Hombre: 23 (85.2)
IMC (kg/m2) ^ϕ	27.3 ± 3.1	29.1 ± 7.9
Factores de riesgo cardiovascular (n (%))		
Hipertensión arterial	Si: 14 (36.4) No: 8 (63.6)	Si: 18 (66.7) No: 9 (33.3)
Tabaquismo pasado	Si: 9 (40.9) No: 13 (59.1)	Si: 24 (88.9) * No: 3 (11.1)
Tabaquismo activo	Si: 10 (45.5) No: 12 (54.5)	Si: 12 (44.4) No: 15 (55.6)
Dislipidemia	Si: 15 (68.2) No: 7 (31.8)	Si: 17 (62.9) * No: 10 (37.1)

IMC = Índice de masa corporal. Todas las variables se muestran como promedio ± DE ^ϕ o n (%), dependiendo del tipo y la distribución de los datos. *p < 0.05 indica

una diferencia estadísticamente significativa. Shapiro Wilks, T-student y Chi cuadrada con el uso del programa estadístico SPSSv26.0.

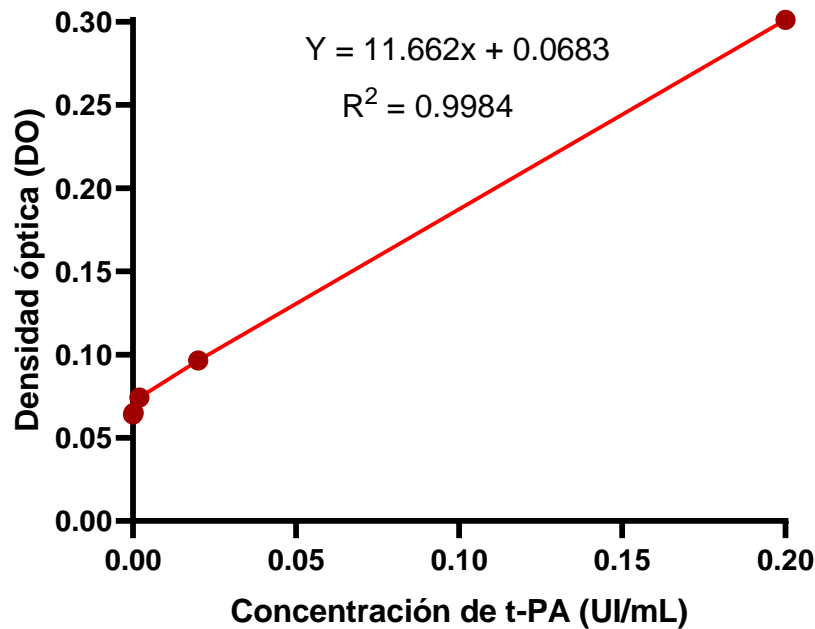
Tabla 11. Situación bioquímica de los pacientes.

Al analizar la situación bioquímica de los pacientes, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de glucosa de diabéticos y no diabéticos ($p < 0.05$).

Variable	Diabéticos (n = 22)	No diabéticos (n = 27)
Hemoglobina (g/L) Φ	13.5 \pm 1.6	14.2 \pm 1.7
Hematocrito (%) Φ	40.2 \pm 5.2	42.6 \pm 5.0
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) Φ	236.4 \pm 72.3	329.2 \pm 47.9
McV (fL) Φ	89.3 \pm 4.3	90.5 \pm 4.2
McH (pg) Φ	30.1 \pm 2.0	30.1 \pm 1.7
VPM (fL) Φ	9.9 \pm 1.5	9.2 \pm 1.1
Colesterol total** (mg/dL)	126 (103 - 160)	152 (121 - 184)
LDL (mg/dL) **	80 (55 - 102)	85 (65 - 115)
HDL (mg/dL) **	39 (29 - 43)	36 (28 - 45)
Triglicéridos (mg/dL) **	118 (99 - 148)	125 (103 - 176)
Glucosa (mg/dL)**	156 (123- 240)	102 (93- 119) *

McH = Hemoglobina corpuscular media, McV = Volumen corpuscular medio, VPM = Volumenplaquetar medio. Los resultados se muestran como promedio \pm DE Φ o mediana (rango intercuartílico (RI)) **, dependiendo de la distribución de los datos.

*p < 0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Shapiro Wilks, t-student, U de Mann Whitney y Chi cuadrada, con el programa estadístico SPSSv26.0.



Gráfica 1. Curva de calibración de la técnica de generación de plasmina. Densidad óptica a 405 nm contra concentración del activador de plasminógeno tipo tisular (UI/mL).

Tabla 12. Concentración de proteína de micropartículas (MPs), concentración de plasmina generada por las MPs y escala de riesgo TIMI de los pacientes.

La concentración de proteína de MPs en el grupo de no diabéticos se encontraba con una diferencia mayor de 18 % respecto a los diabéticos. Ambos grupos tuvieron la capacidad de generar plasmina mayor, lo cual se reflejó en más del 77 % de ambos grupos. Sin embargo, los pacientes no diabéticos formaron mayor concentración de plasmina con una diferencia del 68 %.

Variable	Diabéticos (n = 22)	No diabéticos (n = 27)	Diferencia (%)
Concentración de proteína de MPs (µg/mL)**	118 (100 - 214)	340 (198 - 402)	+ 18
Generación de plasmina (n (%))	Si: 17 (77.3) No: 5 (22.7)	Si: 22 (81.5) No: 5 (18.5)	Si: + 5

Los resultados muestran como mediana (rango intercuartílico) ** o n (%), de acuerdo con la distribución de los datos. *p < 0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Shapiro Wilks, U de Mann Whitney y Chi cuadrada, con el programa estadístico SPSSv26.0.

Tabla 13. Concentración de proteína de MPs, generación y concentración de plasmina generada por las MPs, datos segmentados por tiempo de evolución de la diabetes mellitus tipo 2.

A pesar de generar el subanálisis, se mantiene la característica de las MPs de disminuir su concentración de proteína cuando el tiempo de evolución es igual o mayor a 10 años, sin embargo, presentan capacidad de generar plasmina, incluso a una concentración mayor, con una diferencia del 50 %.

Variable	Tiempo de evolución de la diabetes mellitus tipo 2		Diferencia (%)
	≤ 10 años (n = 8)	> 10 años (n = 14)	
Concentración de proteína de MPs (µg/mL)**	150 (116 - 318)	107 (98 - 199)	- 29
Generación de plasmina (n (%))	Si: 6 (75)	Si: 11 (78.6)	Si: + 3.6

	No: 2 (25)	No: 3 (21.4)	
Concentración de plasmina (x10⁻³ UI/mL)**	1.4 (0.6 - 3.7)	2.1 (1.6 - 4.7)	+ 50

Los resultados se muestran como mediana (rango intercuartílico) o n (%), dependiendo del tipo y distribución de los datos. *p< 0.05 indica una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Shapiro Wilks, U de Mann Whitney y Chi cuadrada, con el programa estadístico SPSSv26.0.

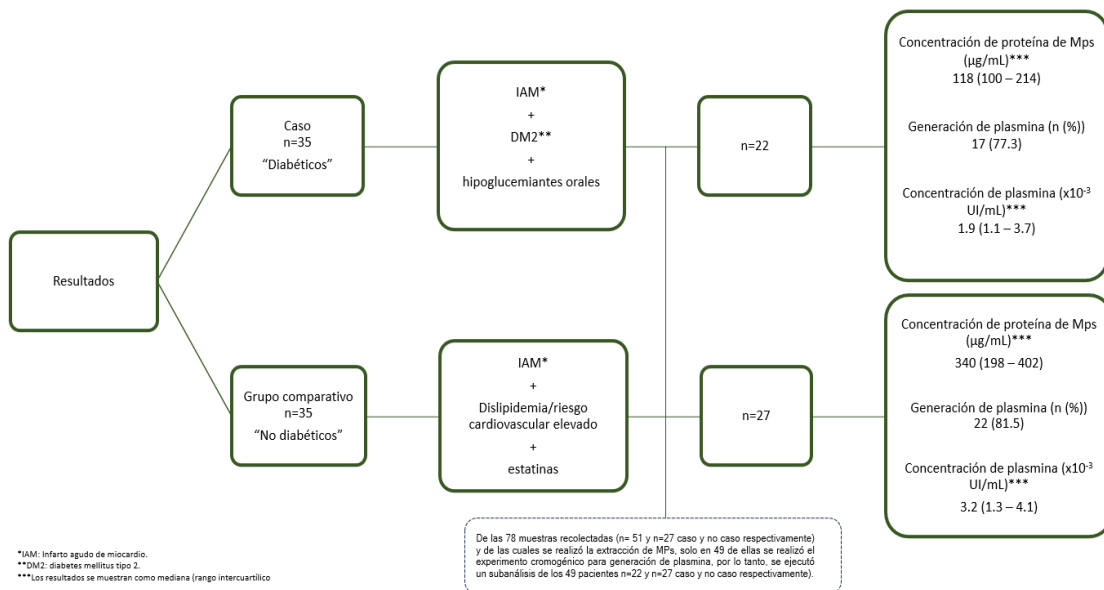


Diagrama 2. Diagrama de flujo de los resultados de concentración de proteína de MPs, generación y concentración de plasmina.

16. Discusión.

Al analizar el comportamiento con las intervenciones farmacológicas específicas (en pacientes con enfermedad cardiovascular de tipo infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST) con hipoglucemiantes orales y estatinas observamos que se modifica la concentración de proteína de MPs, dependiendo el fármaco y la dosis empleada, comparado con la mediana inicial de ambas poblaciones de estudio. El tiempo de evolución y los factores de riesgo asociados son puntos clave para acelerar el proceso de daño endotelial, mantener una inflamación constante crónica de bajo grado y de tal modo propiciar aumento del riesgo cardiovascular, ya que se observa una alteración molecular en el sistema de coagulación. A pesar de que la dislipidemia es un factor de riesgo principal para aterosclerosis y finalmente un desenlace cardiovascular establecido como infarto agudo de miocardio, el uso de estatinas para su control, resultó de suma importancia ya que modulan la concentración de proteína de MPs y aunque estas se encuentran en mayor proporción respecto al grupo de diabéticos, tuvieron la capacidad de formar mayor concentración plasmina en más del 80 % de los pacientes. Es importante recordar el efecto que presentan para estabilizar la placa ateromatosa, evitar su ruptura y disminuir el riesgo de trombosis. Acto que se ve reflejado a nivel molecular en el compartimiento de dichas MPs. Lo que se traduce en un sistema de coagulación con mayor estabilidad y mejor respuesta ante un desenlace cardiovascular para la degradación de depósitos de fibrina. Es decir, las estatinas favorecen la actividad fibrinolítica de las MPs en pacientes infartados independientemente de sus comorbilidades, lo que clínicamente se traduce en un menor riesgo de re-infartos o trombos y de favorecer su degradación, si fuera el caso. Lo que favorece el

panorama clínico de un paciente con riesgo cardiovascular y comorbilidades asociadas. Lo cual, invita a mantener dosis de estatinas en aquellos pacientes que presenten enfermedades crónico degenerativas que propician daño endotelial crónico de bajo grado, aumentado el riesgo cardiovascular como la diabetes mellitus. El control metabólico en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas y riesgo cardiovascular aumentado es de suma importancia para disminuir el daño endotelial y las complicaciones en el sistema de coagulación.

La función de las estatinas no solo es en el control de lípidos, sino también ofrecen efectos pleiotrópicos en el endotelio, disminución de la agregación plaquetaria, disminución de la mortalidad cardiovascular, etc. La relevancia clínica de estos resultados exhortan a mejorar la práctica clínica de carácter preventivo con la intención de disminuir la mortalidad por enfermedades cardiovascular y el impacto en la calidad de vida.

17. Conclusiones.

La mediana de concentración de MPs en los diabéticos resultó de 262 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la de los no diabéticos resultó ser de 340 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tomando en cuenta el tiempo de evolución de los pacientes diabéticos, con más de 10 años de la enfermedad observamos una disminución en la concentración de MPs de 260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = <0.05$) comparado con un tiempo de evolución menor a 10 años.

A pesar de que no se observa un cambio en la concentración de las micropartículas con las distintas dosis de metformina, se observa una disminución significativa en aquellos pacientes tratados con 5 mg/día de glibenclamida de 164 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En el grupo de comparación, no diabéticos; no se observa una disminución

significativa en la concentración de proteína de MPs cuando se administran estatinas respecto a la mediana, con dosis de 40 y 80 mg/día. El 62.9 % de estos pacientes presentaban la prescripción de las estatinas por dislipidemia. Mientras que el 37.1 % presentó riesgo cardiovascular elevado.

En ambos grupos de estudio, el grupo con mayor frecuencia de enfermedad fue el sexo masculino, en más del 70 % de los casos.

Al realizar el subanálisis únicamente con 49 muestras (n = 22 y n = 27) por grupo diabéticos y no diabéticos, respectivamente. Observamos un cambio en la concentración de MPs respecto al análisis inicial de 118 µg/mL en el grupo de diabéticos únicamente. Ambos grupos de estudio mostraron la capacidad de generar plasmina en el 77.3 % y 81.5 % de los casos en diabéticos y no diabéticos, respectivamente. Asimismo, los no diabéticos obtuvieron mayor concentración de plasmina, con una diferencia del 68 %. La relevancia clínica refleja la capacidad fibrinolítica que tienen las MPs en presencia de las estatinas, ya que contribuyen a una mayor concentración de proteína de MPs, favoreciendo aún más la capacidad de generar plasmina y reforzar el sistema de coagulación para poder destruir los depósitos de fibrina ante un evento cardiovascular.

En el caso de los pacientes diabéticos el tiempo de evolución de la enfermedad, no modifica la capacidad de generar plasmina a pesar de que se observa una modificación en la concentración de MPs, con una diferencia de -29 %, en aquellos con un tiempo mayor a 10 años. Sin embargo, se encuentra en menor concentración respecto a los no diabéticos, lo que se traduce en actividad fibrinolítica disminuida. Estableciendo que los hipoglucemiantes orales a pesar del control metabólico que ofrecen no garantizan una protección cardiovascular a nivel molecular. Con lo que

confirmamos nuestra hipótesis de trabajo.

18. Perspectivas.

Tomando en cuenta las interacciones más amplias con las proteínas de la hemostasia en el sistema fibrinolítico, es importante ampliar la investigación sobre la fibrinólisis que desencadenan las MPs en pacientes con enfermedad cardiovascular establecida, para poder obtener análisis molecular con mayor integridad, mejores métodos de diagnóstico y nuevos blancos farmacológicos. Asimismo, es una oportunidad para disminuir la tasa de mortalidad en estos pacientes, teniendo una intervención de carácter preventivo en aquellos que no presentan enfermedad cardiovascular establecida, pero si presentan enfermedades crónicas de tipo cardio-metabólicas.

19. Anexos.

Hoja de consentimiento informado.

FECHA: _____

Yo _____

Declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio bajo el título “Actividad fibrinolítica de las micropartículas en pacientes con Síndrome Coronario Agudo y en tratamiento con hipoglicemiantes orales”.

Mi participación en este estudio consiste en donar una muestra de sangre venosa y arterial de 10mL, que se tomarán durante el estudio de angioplastía, por lo que, para mí, no representa un riesgo agregado.

Los propósitos del estudio son identificar la actividad profibrinolíticas (que se deshagan lo coágulos) de unas partículas muy pequeñas que están presentes en mi sangre. Este estudio favorecerá el conocimiento de la actividad de estas micropartículas y permitirá en un futuro poder señalar que conducta clínica debe seguirse ante su presencia cuando son profibrinolíticas y beneficiar a otros pacientes con nuevos posibles tratamientos.

Puedo, si lo deseo, solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio, así como los resultados de las pruebas efectuadas.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme del presente estudio en el momento que así lo desee. En caso de que decidiera no participar, la atención que como paciente recibo en esta Institución no se verá afectada.

FIRMA DEL PACIENTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

TESTIGO 1 (Nombre completo, firma y fecha)

TESTIGO 2 (Nombre completo, firma y fecha)

Carta de revocación del consentimiento.

Título del protocolo: _____

Investigador principal: Dra. Aurora De la Peña D. / Dra.Mirthala Flores García

Sede donde se realizará el estudio: INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

Nombre del participante: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme e de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea el paciente).

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

Firma del participante o del padre o tutor

Fecha: _____

Testigo _____

Fecha _____

Testigo _____

Fecha _____

c.c.p El paciente.

(Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente)

20. Bibliografía.

Almquist T, Mobarrez F, Jacobson SH, Wallén H, Hjemdahl P. (2016). Effects of lipid-lowering treatment on circulating microparticles in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 31(6):944-52.

Arroyo F, Caraveo C, Reyes M., et al. (2019). Incremento asociado a la edad de la concentración de microparticulas en un grupo de individuos sanos. *Rev Hematol Mex*, S 1;20. 110-11. Disponible en: [hematoSUP2019-HEMOSTASIA-Y-TROMBOSIS.pdf](#).

Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, Macdonough R, Velazques HA, Purow J, Jimenez JJ, Horstman LL, Ferreira A, de Marchena E, Ahn YS. (2004). Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 97(3):439-46.

Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS. (2003). High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 145(6):962-70.

Chen Y, Li G, Liu ML. (2018). Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. Feb;16(1):50-62.

Chiva-Blanch G, Suades R, Padró T, Vilahur G, Peña E, Ybarra J, Pou JM, Badimon L. (2016). Microparticle Shedding by Erythrocytes, Monocytes and Vascular Smooth Muscular Cells Is Reduced by Aspirin in Diabetic Patients. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. jul;69(7):672-80.

Dalli J, Norling LV, Renshaw D, Cooper D, Leung KY, Perretti M. (2008). Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*. Sep 15;112(6):2512-9.

de Gonzalo-Calvo D, Cenarro A, Civeira F, Llorente-Cortes V (2016). microRNA expression profile in human coronary smooth muscle cell-derived microparticles is a source of biomarkers. *Clin Investig Arterioscler*. Jul-Aug;28(4):167-77.

Diamant M, Tushuizen ME, Abid-Hussein MN, Hau CM, Böing AN, Sturk A, Nieuwland R. (2008). Simvastatin-induced endothelial cell detachment and microparticle release are prenylation dependent. *Thromb Haemost*. Sep;100(3):489-97.

Dignat-George F, Boulanger CM. (2011). The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27-37.

Doeuvre, Loïc; Angles-Cano, Eduardo. (2009). Des microparticules cellulaires dévoilent leur fonction fibrinolytique et protéolytique. *MS-medicine Sciences*, 37-44.

Echeverri, Dario, Buitrago, Lorena, Montes, Felix. (2005). Pleiotropic effect of

statins: Useful pharmacological characteristics in prevention, treatment and regression of cardiovascular disease. *Revista Colombiana de Cardiología*. 12(3):95-102.

Espitia-Huerter O P. (2015). Actualidades en coagulación. *Rev Mex Anest*. Vol. 38(Suppl: 1):143-146.

Estadísticas Instituto Nacional de Cardiología. (2019). *Morbilidad enero-marzo 2019*. CDMX. Disponible en https://www.cardiologia.org.mx/transparencia/transparencia_focalizada/estadisticas/

Freyssinet JM, Toti F. (2010). Membrane microparticle determination: at least seeing what's being sized! *J Thromb Haemost*.8(2):311-4.

Furie B, Furie BC. (1992). Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med*. Mar 19;326(12):800-6.

G. Espinosa & J.C. Reverter. (2001). Coagulación y fibrinólisis plasmática. Estados de hipercoagulabilidad. Vol. 38. Núm. 4.s (156) p.156-166.

Gómez, Juan Felipe; Camacho, Paul Anthony; López-López, José; López-Jaramillo, Patricio.(2019). Control and treatment of arterial hypertension; Program 20-20. *Rev. colomb. cardiol* ; 26(2): 99-106, mar.-abr.

Guzmán Grenfell, Alberto M, Maldonado Noriega, Luis, Mendoza Atencio, Remy, & Hicks Gómez, Juan José. (2005). La función plaquetaria más allá de la hemostasis: participación en las enfermedades respiratorias. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(3), 240-246.

Hernández Puentes Yaimara Zunen. (2016). Atherosclerosis and Atherometric System. *Revista Cubana de Medicina Militar*.45(2).

Lacroix R, Plawinski L, Robert S, Doeuvre L, Sabatier F, Martinez de Lizarrondo S, Mezzapesa A, Anfosso F, Leroyer AS, Poullin P, Jourde N, Njock MS, Boulanger CM, Anglés-Cano E, Dignat-George F. (2012). Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica*.Dec;97(12):1864-72.

Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, Robert S, Lamy E, Plawinski L, Camoin-Jau L, Gurewich V, Angles-Cano E, Dignat-George F. (2007). Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*.1;110(7):2432-9.

Martínez-Murillo, C. (2006). Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 44 (Supl 2):51-58.

Matadamas-Zárate, Cuauhtémoc, Hernández-Jerónimo, Julia, Pérez-Campos,

Eduardo, & Majluf-Cruz, Abraham. (2009). Alteraciones plaquetarias en la diabetes mellitus tipo 2. *Archivos de cardiología de México*, 79(Supl. 2), 102-108.

Mobarrez F, He S, Brøijersen A, Wiklund B, Antovic A, Antovic J, Egberg N, Jörneskog G, Wallén H. (2011). Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, P-selectin and GPIIb/IIIa on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost*. 106(2):344-52.

OECD. (2017). *Overweight or obese population*. Obtenido de OECD Data: <https://data.oecd.org/healthrisk/overweight-or-obese-population.html>.

OMS, o. m. (15 de junio de 2019). *Enfermedades cardiovasculares*. OMS. (2019). Disponible en: [Enfermedades cardiovasculares \(who.int\)](http://www.who.int).

Pita Fernández, S. (1996). Determinación del tamaño muestral. *Cad Aten Primaria*, 138-14. Disponible en: [Guía: Determinación del tamaño muestral - Fisterra](#).

Plawinski, L., & Anglés-Cano, E. (2013). Membrane microvesicles: a circulating source for fibrinolysis, new antithrombotic messengers. *Haematologica*, 98, e75 - e76.

Sanchez L. (2017). Caracterización de subpoblaciones de micropartículas en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa. Tesis de Doctorado. Universidad de Sevilla Facultad de Medicina. Departamento de fisiología médica y

biofísica.

Schara K, Jansa V, Sustar V, Dolinar D, Pavlic JI, Lokar M, Kralj-Iglic V, Veranic P, Iglic A. (2009). Mechanisms for the formation of membranous nanostructures in cell-to-cell communication. *Cell Mol Biol Lett.* ;14(4):636-56.

Sims PJ & Wiedmer T. (1995). Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol.* Oct;6(5):275-82.

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 23;7(1):1535750.

Varon D, Shai E. (2015). Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J Thromb Haemost.* Jun;13 Suppl 1: S40-6.

Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience.* 1;65(8):783-797.

Zahran AM, Sayed SK, Abd El Hafeez HA, Khalifa WA, Mohamed NA, Hetta HF. (2019). Circulating microparticle subpopulation in metabolic syndrome: relation to oxidative stress and coagulation markers. *Diabetes Metab Syndr Obes.* Apr 12;

12:485-493.