



**INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL  
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**



**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN**

**EFFECTO DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE EL LIGANDO CD40 PLAQUETARIO  
Y LA FORMA SOLUBLE DE LA MOLECULA DE ADHESION INTERCELULAR  
-1 Y MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR VASCULAR -1 EN PACIENTES  
CON DIABETES MELLITUS-2**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN INVESTIGACION CLINICA**

PRESENTA:

**DR. MAXIMILIANO GARCÍA DE LA PEÑA**

Director de Tesis: DR. RENE MENDEZ CRUZ

Julio de 2008

Este trabajo fue realizado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "La Raza" y en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional bajo la Dirección del Dr. René Méndez Cruz



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 13:00 horas del día 30 del mes de marzo del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESM

para examinar la tesis de grado titulada:

**“Efecto de la Rosiglitazona sobre la expresión del CD40L plaquetario y sobre las concentraciones solubles de las moléculas de adhesión vascular VCAM-1 e ICAM-1 en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2”**

Presentada por el alumno:

GARCÍA  
Apellido paterno

DE LA PEÑA  
materno

MAXIMILIANO  
nombre(s)

Con registro: 

B	0	6	0	8	7	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

Maestro en Ciencias en Investigación Clínica

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Norma Estela Herrera González

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Adolfo René Méndez Cruz

Dra. Guadalupe Cleva Villanueva López

Dr. Santiago Villafaña Rauda

Dr. José Rafael Jiménez Flores

Dr. Juan Asbun Bojalil

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I. P. N.  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día **12** del mes **mayo** del año **2009**, el (la) que suscribe **MAXIMILIANO GARCÍA DE LA PEÑA** alumno (a) del Programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA** con número de registro **B060873** adscrito a la **ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA** manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **DRA. NORMA ESTELA HERRERA GONZÁLEZ** y del **DR. RENÉ MÉNDEZ CRUZ** y cede los derechos al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo al correo electrónico **maxdelapena@gmail.com**. Sí el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



**MAXIMILIANO GARCÍA DE LA PEÑA**

## INDICE

Glosario .....	6
Relación de figuras y tablas .....	9
Resumen .....	10
Abstract .....	11
1. Introducción .....	12
2. Antecedentes .....	15
3. Justificación .....	53
4. Hipótesis .....	55
5. Objetivos .....	56
5.1. Objetivo General .....	56
5.2. Objetivos Particulares .....	56
6. Material y Métodos .....	57
7. Resultados .....	67
8. Discusión .....	86
9. Conclusiones .....	100
10. Perspectivas .....	101
11. Bibliografía .....	102
12. Anexos .....	105
12.1. Anexo No. 1 .....	105
12.2. Anexo No. 2 .....	110

## GLOSARIO

ADP: Adenosin difosfato

AIT: Ataque Isquémico Transitorio

AP-1 Factor de transcripción proteína-1

Apo-E: Apolipoproteína A

APRIL: Ligando Inductor de Proliferación

ATP: Adenosin trifosfato

$\alpha_d\beta_2$  integrina: Receptor plaquetario  $\alpha_d\beta_2$

$\alpha_{IIb}\beta_3$ : Glicoproteína plaquetaria  $\alpha_{IIb}\beta_3$

CAPTURE: Carotid ACCULINK/ACCUNET Post- Approval Trial to Uncover Unanticipated or Rare Events

CD40: Glicoproteína CD40

CD40L: Ligando CD40 o CD154 (complementario a CD40)

CD27 , CD30, CD95 (Fas/Apo), Ox40, DR-3/4/5, RANK, y 4-IBB. Miembros de la superfamilia de receptores de TNF a los cuales pertenece CD40

CD120 a: [Receptor 1 del TNF](#)

CD120 b: [Receptor 2 del TNF](#)

CD62P: P-selectina

[<sup>14</sup>C]-5-HT: 5-Hidroxitriptamina

CXCR-4: Receptor 4 de quimiocinas

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

EVC: Evento Vascular Cerebral

FAS: Ligando FAS vinculado a apoptosis

GM-CSF: Factor estimulante de las colonias de granulocitos macrófagos

HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobina glicada

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HR: Razón de Riesgo (hazard ratio)

II<sub>B</sub>/III<sub>A</sub>: Glicoproteína plaquetaria II<sub>B</sub>/III<sub>A</sub>

ICAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1  
IFN- $\gamma$ : Interferon Gama  
IgSF: Superfamilia de Inmunoglobulinas  
IL-1: Interleucina-1  
IL-4: Interleucina-4  
IL-8: Interleucina-8  
IL-13: Interleucina-13  
IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social  
LDL: Lipoproteínas de baja densidad  
LDLr: receptor de lipoproteinas de baja densidad  
LFA-1: lymphocyte function -associated antigen -1  
Mac-1: Receptor-1 de Macrófago  
MCP-1: Proteína quimiotáctica de Monocito-1  
MIP-1: Proteína inflamatoria del Macrófago-1 alfa  
MMP: Metaloproteinasas de Matriz  
NF-AT: Factor Nuclear de Células T  
NF $\kappa$ B: Factor de Transcripción Nuclear Kappa Beta  
NO: Óxido Nítrico  
OASIS: Organization to Assess Strategies in Acute Ischemic Syndromes Investigators trial.  
OR: Razon de momios (odds ratio)  
Ox40: Receptor CD 134 del neutrófilo  
PAC-1: Compuesto activador procaspasa-1  
PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1  
PF4: Factor plaquetario 4  
PG12: Prostaciclina  
PPAR $\gamma$ : Receptor activador para la proliferación de los peroxisomas gama  
PSGL-1- Glicoproteína P-selectina ligando-1  
RANK: Receptor Activador del Factor de Transcripción Nuclear  $\kappa$  B  
RANTES: Ligando 5 de quimiocina

RNA: Ácido Ribonucléico

RR: Riesgo Relativo

sCD40L: Forma soluble del Ligando CD40 plaquetario

sCD40LT: Forma trimérica de sCD40L

SDF-1: Factor Derivado de Estroma Celular-1

SFLLRN: Péptido Activador del Receptor de Trombina o TRAP

sICAM-1: Forma soluble de la Molécula de Adhesión Intercelular -1

sVCAM-1: Forma soluble de la Molécula de Adhesión Celular Vasculaar-1

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa

TNFR- Receptor de Factor de Necrosis Tumoral

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF

TRAP-1: Péptido Activador del Receptor de Trombina

VCAM-1: Molécula de Adhesión Celular Vascular-1

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

vWF: Factor de vonWillebrand

WHS.- Women's Health Study

41BB: También llamado CD 137, es miembro de la superfamilia de receptors del TNF

## RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

**Figura 1.-** Diagrama de flujo del estudio

**Figura 2.-** Distribución del sexo por grupos

**Figura 3.-** Distribución de tratamiento por grupos

**Figura 4.-** Tiempo de evolución de la Diabetes en los grupos

**Figura 5.-** Distribución de la edad en los grupos

**Figura 6.-** Distribución del IMC en los grupos

**Figura 7.-** Distribución de las comorbilidades en los grupos

**Figura 8.-** Glucosa basal y al final del tratamiento en los grupos de tratamiento

**Figura 9.-** Pérdidas

**Figura 10.-** Expresión del CD40L plaquetario basal, a las semanas 4, 8, y 12 de tratamiento en los grupos de estudio

**Figura 11.-** Expresión del CD40L plaquetario al inicio y a las 4, 8, y 12 semanas de tratamiento en los cuatro subgrupos

**Figura 12.-** Expresión de CD40L plaquetario durante las 12 semanas de tratamiento en los grupos de monoterapia

**Figura 13.-** Expresión del CD40L al inicio y al final de las 12 semanas de tratamiento en el grupo de monoterapia

**Figura 14.-** Expresión de CD40L plaquetario al inicio y al final de las 12 semanas de tratamiento en los grupos de terapia combinada

**Figura 15.-** Concentraciones de VCAM-1 soluble, basales y al final de las 12 semanas de tratamiento en los grupos de estudio

**Figura 16.-** Concentraciones de VCAM-1 solubles, basales y al final de las 12 semanas de tratamiento en los subgrupos de monoterapia.

**Figura 17.-** Concentraciones de VCAM-1 solubles, basales y al final de las 12 semanas de tratamiento en el subgrupo de terapia combinada.

**Figura 18.-** Concentraciones de ICAM-1 solubles, basales y al final de 12 semanas de tratamiento en los grupos de tratamiento.

**Figura 19 .-** Concentraciones de ICAM-1 solubles, basales y al final de 12 semanas de tratamiento en el subgrupo de monoterapia.

**Figura 20.-** Concentraciones de ICAM-1 solubles, basales y al final de 12 semanas de tratamiento en el subgrupo de terapia combinada.

**Tabla 1.-** Características basales de los grupos de tratamiento.

## I. RESUMEN.

**Resumen.** La diabetes mellitus incrementa el riesgo de aterosclerosis y trombosis. Algunos hipoglucemiantes orales pueden atenuar los mecanismos patogénicos implicados en la iniciación, mantenimiento y progresión de la placa de aterosclerosis.

**Objetivo.** Evaluar el efecto de Rosiglitazona en la expresión del Ligando CD40 plaquetario y en la fracción soluble de las moléculas de adhesión vascular ICAM-1 y VCAM-1 en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

**Tipo de estudio.** Ensayo Clínico Aleatorizado Controlado de grupos paralelos.

**Lugar de realización.** Departamento de Medicina Interna del HECMNR.

**Sujetos de estudio.** 40 pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

**Material y métodos.** Los pacientes con diabetes mellitus 2 en tratamiento con Metformin, ya sea como monoterapia o en tratamiento combinado con Glibenclamida, se aleatorizaron a sustituir el Metformin por Rosiglitazona o a continuar con su tratamiento sin cambio. Se tomaron muestras basales y posteriormente cada cuatro semanas durante 12 semanas para determinar CD40 plaquetario mediante citometría de flujo, así como ICAM-1 y VCAM-1 solubles en suero mediante ELISA.

**Resultados.** Al inicio del estudio no hubo diferencia significativa en la expresión de CD40L plaquetario entre los grupos de Metformin y Rosiglitazona ( $4840 \pm 4600$  UFT Vs  $5135 \pm 8335$  UFT,  $p= 0.89$ ) , a las 12 semanas de tratamiento hubo una reducción estadísticamente significativa en el grupo experimental ( $12011 \pm 10390$  UFT Vs  $6146 \pm 4878$  UFT  $p= 0.04$ ). El mayor efecto se observó en el grupo de monoterapia ( $15116$  UFT Vs  $4082$  UFT  $p= 0.01$ ). Las fracciones solubles de VCAM-1 se redujeron en 36% y el ICAM-1 en un 26% en el grupo experimental, no observando este efecto en el grupo control, sin embargo no se alcanzó significancia significativa. De igual manera el mayor efecto se observó en el grupo de monoterapia.

**Conclusiones:** La Rosiglitazona disminuye la expresión del CD40L plaquetario y al mismo tiempo que disminuye los marcadores solubles de activación de las células endoteliales VCAM-1 e ICAM-1 en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

**Palabras Claves:** Diabetes mellitus, Rosiglitazona, Ligando CD40

## ABSTRACT

**Abstract:** Diabetes mellitus increases the risk of atherosclerosis and thrombosis. Some oral hypoglycemic agents may attenuate the pathogenic mechanisms involved in the initiation, maintenance and progression of atherosclerotic plaque.

**Objective:** To assess the effect of Rosiglitazone on the expression of platelet CD40 ligand and the soluble fraction of vascular adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in patients with type 2 diabetes mellitus.

**Type of study:** Randomized Clinical Trial

**Place:** Department of Internal Medicine HECMNR.

**Study subjects:** 40 patients with type 2 diabetes mellitus.

**Material and methods:** The patients with diabetes mellitus type 2 treated with metformin, either as monotherapy or in combination with glibenclamide, were randomized to replaced the Metformin for Rosiglitazone or continue their treatment with no change. Samples were taken at baseline and every four weeks for 12 weeks to determine platelet CD40L platelet by flow cytometry, and ICAM-1 and soluble VCAM-1 in serum by ELISA.

**Results:** At baseline there was no significant difference in the expression of platelet CD40L between the groups of Rosiglitazone and Metformin ( $4840 \pm 4600$  vs.  $5135 \pm 8335$  UFT UFT,  $p = 0.89$ ) at 12 weeks of treatment there was a statistically significant difference in the experimental group ( $12011 \pm 6146$  vs  $10390 \pm 4878$  UFT UFT  $p = 0.04$ ).

The greatest effect was seen in the monotherapy group there was a 19% reduction in the expression of platelet CD40L (baseline 5020 UFT vs. 5072 UFT [ $p = 0.98$ ] and 12 weeks 15116 UFT Vs 4082 UFT [ $p = 0.01$ ]).

Fractions of soluble VCAM-1 were reduced by 36% and ICAM-1 by 26% in the experimental group did not observe this effect in the control group, however not reach statistical significance. Similarly, the greatest effect was observed in the monotherapy group

**Conclusions:** Rosiglitazone decreases the expression of platelet CD40L and simultaneously decreases soluble markers of endothelial cell activation VCAM-1 and ICAM-1 in patients with type 2 diabetes mellitus.

**Key Words:** Diabetes mellitus, Rosiglitazone, CD40 ligand

## 1. INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus es un trastorno en el metabolismo de los carbohidratos que se caracteriza por una hiperglucemia crónica. Esta hiperglucemia conduce a una serie de alteraciones en la homeostasis vascular, incrementando el riesgo de que las personas que la padecen sufran de aterosclerosis en diferentes territorios vasculares. Cuando la placa de ateroma se rompe, se forma un trombo en la luz del vaso. Esta es la causa por la que el 70% a 80% de los pacientes diabéticos muere de un evento trombótico.

El conocimiento de los mecanismos subyacentes que dirigen a la formación de aterosclerosis es imperativo para poder diseñar estrategias terapéuticas que limiten el progreso de la lesión.

Recientemente la vía de señal CD40/CD40L ha surgido como un importante contribuidor en el inicio, mantenimiento y progresión de la aterosclerosis. El CD40 es una glicoproteína fosforilada transmembrana, que se expresa constitutivamente en la superficie plaquetaria. Este receptor también es expresado en las células endoteliales. Su complemento, CD40L (llamado formalmente CD154) es una glicoproteína que se encuentra preformada en el citoplasma de la plaqueta y que tras su activación es expresado en su superficie y después de algunos minutos, se libera a la circulación en una forma soluble, biológicamente activa.

En el endotelio, existen algunas proteínas que son ligandos celulares (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, etc) principalmente de leucocitos, cuya función es reclutar células inflamatorias en sitios de activación endotelial. Entre mayor sea la expresión de este tipo de moléculas, existe un mayor riesgo de sufrir futuros

eventos trombóticos.

Tanto el CD40L expresado en la plaqueta, como su forma soluble (sCD40L) se unen a su complementario CD40 en la superficie de las células endoteliales, activándolas y produciendo la sobre-expresión de moléculas de adhesión celular ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, lo que ocasiona, a su vez, un mayor reclutamiento de células inflamatorias en la pared vascular y contribuyendo de este modo a la progresión de la aterosclerosis.

Se ha demostrado en modelos animales que la interrupción de la vía CD40/CD40L puede limitar las lesiones aterosclerosas.

Las tiazolidinedionas, unos medicamentos utilizados para reducir la glucosa en sangre de pacientes diabéticos, son agonistas del receptor PPAR $\gamma$ . Con base, en el conocimiento de que las plaquetas contienen ligando PPAR $\gamma$  en su citoplasma, se ha estudiado el efecto de estos medicamentos en la función plaquetaria y se ha observado que atenúa la activación plaquetaria al interrumpir la vía de señal CD40/CD40L. Así mismo, se han evaluado las concentraciones séricas de la fracción soluble de CD40L posterior al tratamiento con Rosiglitazona, demostrando que también puede reducirse esta fracción en suero de pacientes tratados, sin que hasta el momento haya sido evaluado el efecto directamente en las células implicadas, ni las consecuencias inmediatas en las moléculas que reflejan la activación endotelial.

Es por ello que nos propusimos la hipótesis de que el tratamiento con Rosiglitazona puede disminuir la expresión del CD40 en la superficie plaquetaria, así como reducir las concentraciones plasmáticas de la fracción soluble de las

moléculas de adhesión celular del endotelio vascular ICAM-1 y VCAM-1 en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

## 2. ANTECEDENTES

### 1.- Diabetes Mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2, es una enfermedad que se caracteriza por una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, cuya característica principal es un estado de hiperglucemia crónica.

Actualmente, la diabetes mellitus está presente en proporciones epidémicas, constituyendo un grave problema de salud pública, siendo la enfermedad metabólica más común, estimándose que para el año 2010 habrá en el mundo 216 millones de individuos afectados (1).

En México, según reportes de la encuesta nacional de salud del año 2000 en los individuos de 20 años o mayores la prevalencia de Diabetes fue de 7.5%. Al expandir estos resultados se estimó que existen al menos 2.8 millones de adultos que se conocen diabéticos. Además 820 mil sujetos están afectados pero no habían sido diagnosticados. La prevalencia fue ligeramente mayor en mujeres que en los hombres (7.8% y 7.2% respectivamente). La prevalencia en derechohabientes del IMSS fue de 8.9% (2).

Datos más recientes aunque aún preliminares reportados en la ENSANUT 2006 encontró una prevalencia prácticamente idéntica siendo de 7% a nivel nacional, aunque los datos definitivos aún están por confirmarse (3).

Los individuos con diabetes tienen un riesgo elevado de padecer enfermedades secundarias en diversos órganos diana como lo son el riñón, retina y sistema nervioso central y periférico, entre otros. Esta alteración en la homeostasis de los órganos y sistemas se debe en gran parte al daño vascular que se encuentra

asociado a la diabetes, tanto en vasos de pequeño calibre (microangiopatía) como en los de gran calibre (macroangiopatía), lo cual predispone al sujeto diabético a sufrir aterosclerosis.

## **2.- Aterosclerosis**

La *arterioesclerosis* es el término genérico usado para referirse al endurecimiento de las arterias de todos los tamaños. A diferencia de la *aterosclerosis*, término descriptivo para las lesiones gruesas y duras de la muscular de las arterias elásticas. Estas lesiones son ricas en lípidos y suceden en la íntima, aunque la media y la adventicia también pueden estar involucradas. Las lesiones son generalmente excéntricas y, se pueden complicar con la formación de un trombo ya sea mural u oclusivo, pudiendo causar isquemia, con el inicio de angina o necrosis y la secuela clínica característica del infarto al miocardio, infarto cerebral o gangrena de las extremidades, entonces el término es llamado *aterotrombosis* (4).

El impacto derivado de las complicaciones de la aterosclerosis es enorme. Las enfermedades cardiovasculares, incluyendo el EVC, son la principal causa de enfermedad y muerte en la mayoría de los países. En estados Unidos se estima que existen 62 millones de personas con enfermedad cardiovascular y 50 millones de personas con hipertensión. En el año 2000, aproximadamente 946, 000 muertes se atribuyen a enfermedad cardiovascular, representando el 39% de todas las muertes en los Estados Unidos (5).

### **3.- Diabetes Mellitus como factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares**

Los pacientes con diabetes tienen un riesgo incrementado de padecer enfermedad cardiovascular, un riesgo que contribuye a disminuir significativamente la expectativa de vida. Se espera que las enfermedades cardiovasculares sean la principal causa de mortalidad a nivel mundial en los próximos 15 años debido a un rápido incremento en la prevalencia en países en desarrollo y en Europa del este, además al incremento en la prevalencia de obesidad y diabetes en el mundo occidental. Las enfermedades cardiovasculares también son la causa más común de muerte en hombres europeos de menos de 65 años y la segunda causa de muerte en mujeres (6).

El riesgo de sufrir un infarto en pacientes con diabetes es comparable al de la recurrencia de un infarto en una persona sin diabetes. De los pacientes con diabetes el 75 a 80% muere a causa de un evento trombótico. La diabetes está asociada con un incremento de 2 a 4 veces en el riesgo de enfermedad cardiovascular. Este incremento en el riesgo es el principal factor subyacente al exceso de mortalidad y reducción en la expectativa de vida de personas con diabetes mellitus tipo 2. La expectativa de vida de un hombre o mujer que se diagnostica con diabetes a los 40 años de edad se reduce un estimado de 8 años en comparación con individuos sin diabetes. En un meta-análisis de 27 estudios que reportaron la muerte total de enfermedad coronaria de acuerdo a su estado de diabetes, el riesgo para enfermedad coronaria fatal fue 3 veces más alto en personas con diabetes tipo 2 que en aquellos sin diabetes (5.4% Vs 1.6%); también

el riesgo relativo de evento coronario fatal se encontró 50% más alto en hombres que en mujeres.

Una variedad de mecanismos subyacen el incremento en el riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con diabetes. La resistencia a la insulina en el músculo esquelético disminuye el aprovechamiento de la glucosa y el uso de ácidos grasos libres, ocasionando hiperglucemia y altos niveles de ácidos grasos libres circulantes e hiperinsulinemia compensatoria. Un exceso de ácidos grasos libres estimula la sobreproducción de partículas lipoprotéicas ricas en triglicéridos, incluyendo las aterogénicas lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y una disminución en las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Esta dislipidemia ocasiona disfunción endotelial, un estado de deficiencia de óxido nítrico e incremento en los mediadores que promueven la vasoconstricción y aceleran la formación, progresión, y ruptura de la placa aterosclerótica; la disfunción endotelial ocasiona mayor deterioro de la acción de la insulina y un ciclo de retroalimentación negativo. El depósito de los lípidos, particularmente de lipoproteínas de muy baja densidad, y el estrés oxidativo en la pared de los vasos causa liberación de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (como Interleucina-1, TNF- $\alpha$ , y molécula de adhesión celular vascular-1), las cuales instauran una cadena de respuestas que finalmente ocasionan la formación de células espumosas y el subsecuente desarrollo de las lesiones ateroscleróticas vulnerables a ruptura. Los resultados de estudios de ratas con diabetes sugieren que la expresión de genes de colágeno está incrementada en diabetes, conduciendo a la elaboración de matriz extracelular. La disminución en la síntesis

y actividad de las metaloproteinasas en la diabetes contribuye a un incremento en el depósito de colágeno y al remodelado patológico en la vasculatura arterial. Las concentraciones elevadas de glucosa pueden inducir una regulación discordante del sistema MMP en las células vasculares. El incremento en las actividades de MMP-1, MMP-1, y MMP-9 inducidas por los altos niveles de glucosa pueden promover la degradación de la matriz, acelerando así la aterogénesis y reduciendo potencialmente la estabilidad de la placa. Las placas obtenidas de pacientes con diabetes contienen más macrófagos, los cuales secretan MMPs, y menos colágeno comparadas con aquellas de pacientes sin diabetes, y se piensa que así las placas serán más inestables que las de pacientes sin diabetes.

La diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico (incluyendo la resistencia a la insulina) que frecuentemente subyace, es un estado de hiper coagulabilidad caracterizado por un incremento en la reactividad plaquetaria, mayor actividad del sistema de coagulación, y deterioro en la fibrinólisis; predisponiendo así a la aterosclerosis. El aumento de los agregados plaquetarios circulantes, la agregación plaquetaria en respuesta a los agonistas plaquetarios y la fuerza contractil, y la presencia de elevadas concentraciones de productos de liberación plaquetaria en plasma, como tromboxano B<sub>2</sub>, Beta trombomodulina, factor plaquetario 4, proporcionan evidencia de la hiperactividad plaquetaria en pacientes con diabetes. Las concentraciones de varios marcadores de activación de la coagulación, como fragmentos de activación de protrombina 1 y 2 y complejos trombina-antitrombina, están incrementados en pacientes con diabetes, así como los marcadores en plasma de los factores para trombosis (fibrinógeno, Factor VII,

Factor VIII, Factor XI, Factor XII, calicreina, y factor de von Willebrand). El sistema fibrinolítico (primera medida para remover el coágulo) es menos efectiva en diabetes debido las estructuras anormales del coágulo que son más resistentes a la degradación, y se suprimen como resultado de las altas concentraciones sanguíneas de inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). La expresión y secreción de PAI-1 en el endotelio de las células musculares lisas está incrementado en pacientes con diabetes por insulina, moléculas relacionadas a insulina, y triglicéridos VLDL; tanto en especímenes de ateroma de pacientes que se someten a angioplastia transluminal percutánea como en los pacientes sometidos a cirugía revascularización coronaria las concentraciones de PAI-1 son sustancialmente más altas que en aquellas de pacientes sin diabetes con un grado similar de enfermedad cardiovascular.(7)

Todas estas alteraciones moleculares, se reflejan en los resultados adversos observados en estudios clínicos que incluyen a pacientes diabéticos:

Después de sufrir un síndrome coronario agudo e infarto al miocardio las personas con diabetes experimentan una mayor morbi- mortalidad que las personas sin diabetes (8). El análisis de los datos recolectados por la organización para la evaluación de las estrategias de síndromes isquémicos (OASIS), mostró que la diabetes incrementa significativamente la muerte por todas las causas y la incidencia de un nuevo infarto al miocardio, EVC, e insuficiencia cardíaca durante un seguimiento medio de dos años en pacientes quienes estuvieron hospitalizados por angina inestable o infarto al miocardio sin onda Q. Un estudio similar de pacientes hospitalizados con un infarto al miocardio confirmado, encontró que la

diabetes estuvo asociada con una razón de riesgo ajustada para mortalidad de 1.7 (IC 95% 1.2 a 2.3) comparada con pacientes sin diabetes y sin infarto al miocardio previo (9).

En general la diabetes confiere tanto riesgo adicional como el haber padecido previamente un infarto al miocardio, y el número de eventos cardiovasculares asociados con diabetes continúa en crecimiento. En la ciudad de Nueva York en la década de 1989 a 1999, el porcentaje de todos los infartos al miocardio ocurridos en pacientes diabéticos se incrementó de 21% a 36%, y el número de días hospitalizados asociados con infarto al miocardio se incrementó un 51% a pesar de la reducción en los días de hospitalización en pacientes con infarto al miocardio en la población general (10).

Además de los factores de riesgo tradicionales asociados a enfermedad cardiovascular e insuficiencia cardíaca, un número de factores de riesgo específicos de diabetes contribuyen al incremento en la morbilidad y mortalidad de la enfermedad arterial coronaria. Por ejemplo, los pacientes con diabetes tienen placas ateroscleróticas ricas en lípidos que son más vulnerables a la ruptura que aquellas encontradas en pacientes sin diabetes. (11)

El análisis de las placas de ateroma tomadas de pacientes diabéticos sometidos a endarterectomía indican que contienen más tipos de células inflamatorias y marcadores inflamatorios y tiene un mayor contenido lipídico que las placas de sujetos no diabéticos. Este incremento en la reacción inflamatoria puede resultar de una sobre-expresión de receptores de productos finales de la glucosilación avanzada, los cuales correlacionan linealmente con los niveles de HbA1c . Los

productos finales de la glucosilación avanzada pueden incrementar la actividad de las metaloproteinasas de la matriz lo cual puede desestabilizar la placa. Adicionalmente, las plaquetas tomadas de pacientes diabéticos exhiben un incremento en la agregabilidad e incremento en la expresión de moléculas de adhesión dependientes de activación, como glicoproteína II<sub>B</sub>/III<sub>A</sub> y CD40L, factores que contribuyen a la formación del trombo (12).

La diabetes también incrementa el riesgo de insuficiencia cardiaca. Los pacientes con diabetes tienen dos a cinco veces más probabilidad de desarrollar insuficiencia cardiaca que aquellos sin diabetes (13) y siguiendo al desarrollo de insuficiencia cardiaca, los pacientes diabéticos tienen una mayor mortalidad y morbilidad asociada a insuficiencia cardiaca (14).

Como podemos observar, es evidente la importancia que tiene la diabetes en el riesgo de desarrollar aterosclerosis, y no menor es la relevancia de las complicaciones trombóticas, generando elevada mortalidad y una impresionante carga para los sistemas de salud.

### **3.- Moléculas de Adhesión Celular: ICAM-1 y VCAM-1**

Las moléculas de adhesión celular, son estructuras codificadas por genes de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), y consisten en más de 25 moléculas que tiene una serie de dominios globulares, formados por puentes disulfuro, semejando aquellos encontrados en las inmunoglobulinas. Como con las integrinas, estas moléculas son responsables de la adhesión a otros ligandos de superficie celular y tienen importantes funciones de señal.

**Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, CD54).** Fue originalmente descubierta como una molécula responsable para adhesión celular heterotípica. Su porción extracelular está organizada en cinco dominios Ig-like. Los ligandos para la mayoría de los dominios N-terminal de ICAM-1 incluyen LFA-1, fibrinógeno, y la mayoría de los serotipos de rinovirus, mientras el tercer dominio es reconocido por MAC-1. ICAM-1 es constitutivamente expresada a lo largo de la superficie luminal, intercelular, y subluminal de las células endoteliales. Varios estímulos incluyendo IL-1, TNF $\alpha$ , endotoxinas bacterianas, y IFN- $\gamma$  son capaces de inducir un incremento en su expresión, pero IFN- $\gamma$  induce selectivamente la expresión de ICAM-1 sin afectar la expresión de otras moléculas de expresión. La expresión de ICAM-1 puede inducirse sobre los eosinófilos así como en otras células, incluyendo células epiteliales de respiratorias.

**Molécula de Adhesión Celular Vascular-1 (VCAM-1, CD106).** Fue originalmente identificada como una estructura celular inducible por citocinas. Puede expresarse en dos modos diferentes, existiendo principalmente en una forma de siete dominios (648 aminoácidos de longitud) y otra forma más rara e seis dominios. Existe una gran homología entre los dominios N-terminal y los dominios 4 a 6, probablemente un resultado de la duplicación genética. La expresión de VCAM-1 ha sido detectada sobre otros tipos celulares aparte del endotelio, incluyendo macrófagos, células dendríticas, astrocitos, células estromales de médula ósea, y líneas celulares del epitelio respiratorio. La expresión de VCAM-1 sobre células endoteliales de vena umbilical está concentrada principalmente sobre la superficie luminal. VCAM-1 puede ser

inducida de novo dentro de varias horas después de la exposición a IL-1, TNF- $\alpha$ , o endotoxina bacteriana; la expresión alcanza niveles máximos a las 24 a 48 hrs. Sin embargo, estas condiciones de tratamiento ocasionan la incremento en la expresión de otras moléculas de adhesión endoteliales, incluyendo ICAM-1 y E-selectina. En contraste, el tratamiento de células endoteliales con IL-4 o IL-13 ocasiona una inducción selectiva de VCAM-1, y la combinación de IL-4 con TNF- $\alpha$  es sinérgica debido a la activación transcripcional y estabilización del RNA mensajero de VCAM-1 (15).

Las moléculas de adhesión celular han sido evaluadas como marcadores de riesgo de futuros eventos cardiovasculares.

En un estudio de cohorte realizado entre noviembre 1996 y junio 2000, a un total de 1246 pacientes incluidos originalmente en el estudio AtheroGene, se les determinaron las concentraciones basales de sVCAM-1, sICAM-1, y E-selectina y se siguieron un promedio de 2.7 años.

La razón de riesgo ajustada asociada con concentraciones basales de sVCAM-1 que excedían el umbral del percentil 75 fue de 2.6 (IC 95% 1.5 a 4.4, P=0.001). Con el percentil 50<sup>a</sup> usada como punto de corte, la razón de riesgo asociada con las concentraciones basales de sICAM o E-selectina que excedían este umbral fue de 2.1 (IC 95% 1.3 a 3.5, P=0.003) y 2.2 (IC 95% 1.3 a 4.0, P=0.005), respectivamente.

Cuando se analizaron los puntos finales primarios combinados de quienes murieron de causas cardiovasculares o infartos no fatales, después de ajustar

para los factores de riesgo clásicos, clínicos, y características terapéuticas, las concentraciones de sVCAM permanecieron como factores predictivos independientes. Concluyendo que estas moléculas de adhesión celulares constituyen elementos que pueden predecir futuros eventos cardiovasculares (16). De igual manera Iqbal Malik y cols. publicaron una cohorte de 643 pacientes con enfermedad arterial coronaria, midiendo las concentraciones basales de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y P-selectina y la compararon con 1278 pacientes controles que se habían monitorizado durante 16 años. En sus resultados observaron que para ICAM-1, la OR para enfermedad cardiovascular fue de 1.68 (IC95% 1.32-2.14). Para VCAM-1 la OR para enfermedad cardiovascular fue de 1.26 (0.99-1.61), concluyendo igualmente que constituyen fuertes predictores de riesgo cardiovascular (17).

#### **4.- Las Plaquetas y su papel en la Aterosclerosis**

Las plaquetas son pequeños fragmentos anucleados que se forman del citoplasma de los megacariocitos de la médula ósea y tiene forma de discos aplanados. Para formar y liberar las plaquetas, los megacariocitos se convierten en células poliploides por endomitosis y siguen un programa de maduración que consiste en un incremento del volumen de su citoplasma y en la formación múltiples procesos largos llamados proplaquetas. Un megacariocito puede dar lugar hasta 10 a 20 proplaquetas; cada una de ellas inicia como una protrusión roma y con el curso del tiempo se adelgaza progresivamente hasta formar las plaquetas. Conforme se están desarrollando, el contenido de gránulos y organelos citoplásmicos se reparte

entre ellas. Una vez que las plaquetas nacientes se llenan con sus componentes y un solo microtubulo (de aproximadamente 100µm de longitud) es llevada a la periferia y liberada a la circulación. Este proceso de formación de la plaqueta puede dividirse arbitrariamente en dos fases. La primera etapa requiere días para completarse, se induce por factores de crecimiento específicos de megacariocitos. Esta fase se caracteriza por una proliferación nuclear masiva de hasta 4-64 veces la cantidad normal de DNA y por el crecimiento del citoplasma de los megacariocitos el cual se llena con proteínas del citoesqueleto, gránulos específicos de plaquetas, y suficiente membrana para completar el proceso de formación de la plaqueta. En la segunda etapa, la cual es relativamente rápida y se completa en horas, las proplaquetas maduran y los pequeños discos plaquetarios una vez maduros son liberados a la circulación. Las plaquetas contienen en su citoplasma dos tipos de gránulos que almacenan, y una vez activadas liberan su contenido : 1) gránulos- $\alpha$ , los cuales contienen proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, trombospondina, y vWF), procoagulantes (factor V, factor 4 plaquetario [PF4]), factores de crecimiento, proteínas de adhesión (P-selectina), y enzimas (plasminógeno); y 2) gránulos densos, los cuales contienen ADP, adenosin trifosfato (ATP), serotonina y otros factores. El rango de vida media de las plaquetas en la circulación es de 7 a 10 días, alrededor de una tercera parte de las ellas se encuentra en el bazo en una reserva intercambiable. La evidencia muestra que en individuos normales la mayoría de las plaquetas son removidas por envejecimiento más que por utilización. Las plaquetas no sólo secretan factores pro-coagulantes, sino que también endocitan

moléculas de la circulación (18)

La idea tradicional que se tiene de las plaquetas es a considerarlas simplemente como fragmentos subcelulares y anucleares que se encuentran circulando en la sangre como pequeños discos mitigando hemorragias. Este proceso hemostático requiere la activación plaquetaria, una compleja cadena de eventos que involucran unos rápidos cambios estructurales que activan receptores de adhesión, remodelación del citoesqueleto, y que conducen a la eventual síntesis y secreción de varios factores derivados de las plaquetas. El resultado de esta cascada es la formación de un trombo dependiente de plaquetas que atenúa principalmente la hemorragia pero, desde el punto de vista fisiopatológico, contribuye a los eventos vasculares oclusivos.

Estas realidades clínicas han conducido a la falsa idea que las plaquetas están involucradas casi exclusivamente en la trombosis y hemostasia. Este sesgo se ha reflejado principalmente en el uso predominante de la agregometría plaquetaria como el método estándar para cuantificar la activación plaquetaria *ex vivo*. Esta técnica, sin embargo, sólo identifica la unión plaqueta-plaqueta (agregados homotípicos) y, en el sentido clínico, ha promovido a una visión relativamente simplista de la función plaquetaria. La atención en la trombosis dependiente de plaqueta ha hecho de la agregación plaquetaria un objetivo terapéutico común en los síndromes que involucran la oclusión vascular. Sin embargo, el proceso meramente preventivo de la unión plaqueta-plaqueta no siempre puede traducirse en eficacia clínica como se ha visto en los recientes resultados decepcionantes asociados con el uso de los inhibidores orales II<sub>b</sub>/III<sub>a</sub>. (19)

Esta idea clásica acerca de que la principal función de una plaqueta se encuentra en la hemostasia ha cambiado debido a las investigaciones realizadas en últimos años, las cuales confirman a las plaquetas como elementos importantes mediadores de inflamación crónica. El campo de la biología de la plaqueta rápidamente se está expandiendo y ha vinculado a la plaqueta a las complicaciones vasculares observadas en enfermedades cardiovasculares y en diabetes mellitus tipo 2.

Se conoce que las plaquetas producen mediadores inflamatorios incluyendo factores de crecimiento derivados de plaquetas, factor plaquetario 4, y factor de crecimiento transformante  $\beta$ . Se sabe también que las plaquetas se unen, vía P-selectina (CD62P) que se expresa en la superficie de las plaquetas activadas, a los receptores de leucocitos, glicoproteína P-selectina ligando-1 (PSGL-1). La relevancia de esta unión se sustenta por un estudio que demuestra que la infusión de la forma soluble recombinante humana de glicoproteína P-selectina ligando-1 en un modelo animal de lesión vascular redujo la lesión miocárdica por reperfusión y preservó la función del endotelio vascular. La implicación clínica de los agregados heterotrópicos se evidencia en los estudios que demuestran que después del infarto agudo al miocardio, los agregados monocitos-plaquetas están incrementados y son un marcador más sensible de activación plaquetaria in vivo que la P-selectina de la superficie plaquetaria. La ruptura de la placa promueve la activación de la respuesta inflamatoria, y el hallazgo consistente de los agregados heterotrópicos subraya la estrecha interacción entre la inflamación y la trombosis en la enfermedad vascular.

Ninguna plaqueta es idéntica en tamaño, composición, forma, y densidad. Algunas plaquetas, especialmente bajo ciertas condiciones patológicas, presentan un fenotipo más activado. El incremento en el tamaño plaquetario ha sido asociado a diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, angina inestable, infarto al miocardio y aterosclerosis, y puede ser parcialmente responsable por las plaquetas hiperactivas características de estas enfermedades. Las plaquetas más grandes tienen incrementada la sensibilidad al ADP, una molécula clave activadora de la plaqueta, y rápidamente forman agregados. Estas características pueden ser debidas a otros factores como el área de superficie debido a que la diferencia en los tamaños puede acoplarse a alteraciones en la composición plaquetaria.

No sólo las plaquetas de individuos con DM2 y ECV tienen incrementados los niveles de bioactivadores, sino que además muestran una reducción en la respuesta a mediadores que normalmente atenúan la activación. Las plaquetas de diabéticos son menos sensibles a los efectos de la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y óxido nítrico (NO), dos moléculas que inhiben la agregación plaquetaria. Los individuos ateroscleróticos tienen disminuido el óxido nítrico debido a que las células endoteliales dañadas no pueden producir óxido nítrico adecuadamente para disminuir la respuesta inflamatoria. Otro factor confusor para hiperactividad en plaquetas de diabéticos son los niveles disminuidos de antioxidantes los cuales están asociados con un incremento en la agregabilidad y niveles reducidos de vitamina C (20).

#### **5.- Ligando CD40 plaquetario y Ligando CD40 soluble**

Contribuyendo a nuestro entendimiento del papel de las plaquetas en la

inflamación están las interacciones del ligando CD40/CD40L.

El CD40 es una glicoproteína fosforilada que pertenece a la superfamilia de receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) que también incluye TNFR tipo 1 (p55-TNFR, CD120a) y tipo II (p75-TNFR, CD120 b), receptor de factor de crecimiento nervioso de baja afinidad, CD27, CD30, CD95 (Fas/Apo), Ox40, DR-3/4/5, RANK, y 4-1BB. La transcripción del gen produce una proteína transmembrana tipo 1 de 48kDa que comprende 277 aminoácidos. Esta transcripción probablemente ocurre vía activación del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF $\kappa\beta$ ) dentro de la región promotora. A nivel de aminoácidos, el CD40 humano y murino comparten 62% de la similitud de secuencia del dominio intracelular y los 32 residuos C-terminales alcanzan una equivalencia del 78% y 100% respectivamente. Los modelos tridimensionales de la región extracelular de CD40 indicaron una fuerte homología estructural al TNFR. Se describió inicialmente en células del carcinoma de vejiga, pero ahora se sabe que también se expresa en linfocitos B, Linfocitos T CD4+, monocitos, células dendríticas, y células endoteliales sugiriendo que el CD40 tiene una amplia función in vivo. Estas células comúnmente expresan el receptor constitutivamente in vitro y muestran expresión basal en tejidos no enfermos. La estimulación con citocinas proinflamatorias, p.ej IL-1, IL-3, TNF-alfa, GM-CSF, y particularmente IFN- $\gamma$ , incrementa la expresión de CD40 in vitro.

El complemento o ligando para el CD40, (CD40L, formalmente llamado CD154), es una glicoproteína miembro de la superfamilia de genes de TNF, a la que pertenecen moléculas como TNF- $\alpha$ , ligando CD27, ligando CD30, Ligando FAS,

linfotóxina  $\alpha/\beta$ , APRIL, ligando RANK, ligando Ox40, y TRAIL. La clonación de CD40L humano de linfocitos T periféricos activados usando sonda murina reveló una secuencia de 13 kb de DNA, la cual comparte 80% de similitud con su contraparte murina. La transcripción de los genes CD40L alcanza unos 2.3 kb de mRNA, codificando una proteína transmembrana tipo II de 261 aminoácidos. Además de la proteína de 39kd asociada a la célula, formas más pequeñas solubles del ligando se incrementan por mecanismos desconocidos.

Aparte de la fuente original, los linfocitos T activados, numerosos tipos celulares expresan CD40L, incluyendo aquellos implicados en aterogénesis, principalmente células endoteliales, células de músculo liso, macrófagos y plaquetas. En contraste con el CD40, los cultivos de células inactivas y tejidos no enfermos típicamente no expresan el ligando de manera constitutiva. Además de las señales a través del receptor de células T para antígenos, las citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , así como los glucocorticoides, inducen la expresión del ligando en linfocitos T, probablemente al activar el factor de transcripción proteína-1 (AP-1) y el factor nuclear de las células T (NF-AT). Es de recalcar que el CD40L puede inducir su propia expresión.

Los trabajos iniciales sobre el receptor CD40 y su contraparte el ligando CD40L (CD40L), consideraron su expresión limitada a los linfocitos B y linfocitos T CD4+, respectivamente. Por lo tanto, los estudios funcionales se enfocaron sobre el papel de las señales de CD40 en la interacción de linfocitos B/T, mediando la activación y diferenciación de células B dependiente de células T requerida para las respuestas humorales maduras. La importancia de las interacciones

CD40/CD40L en la respuesta inmune adaptativa fue enfatizada, por el descubrimiento de que las mutaciones en el gen de CD40L que ocasionan una alteración entre éste y su complementario CD40 precipitan inmunodeficiencias severas tanto en modelos animales como humanos. Un ejemplo de ello es el síndrome de Hiper IgM ligado al X, una rara inmunodeficiencia caracterizada por la ausencia de células B switcheadas de clase y de producción de anticuerpos de alta afinidad.

Aunque en algún tiempo las interacciones CD40/CD40L se reconocieron como de importancia crítica en la respuesta inmune adaptativa, ahora también se ha demostrado que el CD40 regula una amplia gama de funciones biológicas in vivo e in vitro, extendiéndose su función desde de la inmunidad celular a la inflamación, dos procesos íntimamente involucrados en la aterogénesis (21).

Recientes trabajos han demostrado que las señales CD40L/CD40 son críticas en la patogénesis de la aterosclerosis. La identificación de los linfocitos T como la fuente original de CD40L en 1992 (22), junto con la presencia de linfocitos T crónicamente activados en ateromas humanos, sentó las bases para el posible compromiso de este mediador inmune en la aterogénesis. Solo un año después Cocks y colaboradores (23) demostraron la expresión de transcritos de CD40L en cultivos de macrófagos. Más tarde, Alderson y cols, mostraron que la expresión constitutiva de la proteína CD40 en estos tipos celulares se incrementó en respuesta a mediadores proinflamatorios de granulocitos, factor estimulador de la colonia de granulocitos macrófagos e interferón  $\gamma$ , moléculas sobre-expresadas en ateromas humanos. En 1995, tres grupos reportaron independientemente la

expresión funcional de CD40 sobre las células endoteliales. Los cultivos de células endoteliales así como el endotelio de tejido no enfermo expresó este receptor constitutivamente. La estimulación con IL-1, TNF- $\alpha$ , y particularmente IFN- $\gamma$ , citocinas proinflamatorias abundantes en el ateroma, incrementó la expresión de CD40 endotelial *in vitro*. En 1997 se reportó (24) la co-localización tanto de CD40 como de CD40L en las células endoteliales asociadas a ateroma, células de músculo liso, y cultivo de macrófagos *in vivo* e *in situ*. Además, los linfocitos T dentro de las lesiones ateroscleróticas humanas también expresaron CD40L. Aunque originalmente fue controversial, varios grupos han confirmado subsecuentemente la expresión de CD40L sobre tipos celulares no linfocíticos. Tanto el receptor como el ligando, se expresaron en cultivos de células endoteliales, células de músculo liso, y cultivos de macrófagos, estando funcional, mediando varios procesos proaterogénicos. En estudios posteriores, se demostró la expresión de CD40 y CD40L en tejido ateromatoso de ratones hipercolesterolémicos con un patrón de tinción similar al que se observó en humanos.

Dada la prominencia de CD40 y CD40L en ateromas humanos y experimentales, se demostró que la interrupción de la señal de CD40 modifica esta enfermedad. El tratamiento con anticuerpos anti CD40L de ratón limitó la aterosclerosis en ratones deficientes de receptor LDL los cuales habían consumido una dieta alta en colesterol durante 12 semanas, reduciendo significativamente el tamaño y contenido de lípidos de las lesiones ateroscleróticas en la aorta. Además, el ateroma de los ratones tratados con anti-CD40L contenía marcadamente menor

cantidad de macrófagos y linfocitos T, y mostró una expresión reducida de moléculas de adhesión y metaloproteinasas de matriz comparado con los controles. Los estudios usando receptor de CD40L/ lipoproteínas de baja densidad (LDLr) o ratones mutantes doble deficientes de CD40L/apolipoproteína E confirmaron el papel crucial de la señal de CD40 durante la iniciación y progresión de las lesiones ateroscleróticas en dos diferentes cepas de ratones. Estos hallazgos proporcionan no sólo evidencia de la importancia de las vías inflamatorias en la formación de ateroma en respuesta a elevadas cantidades LDL, sino que además puntualizan las interacciones de CD40/CD40L como potenciales blancos terapéuticos. De particular importancia es que la interrupción de las señales alteró la composición del ateroma. El tratamiento con anticuerpo condujo a una disminución del contenido de mediadores proaterogénicos como los macrófagos, lípidos y citocinas proinflamatorias, pero relativamente elevado contenido de células de músculo liso y colágeno fibrilar, la principal molécula dentro de la capa fibrosa de la placa.

La interacción CD40/CD40L juega un papel importante en toda la historia natural de la aterosclerosis, desde su iniciación, progresión hasta las complicaciones trombóticas agudas consecuencia de la misma.

Aún permanece incierto cual es el detonante inicial de la expresión de CD40 y CD40L dentro de los linfocitos T, macrófagos, células endoteliales y células de músculo liso. Sin embargo, los candidatos involucrados podemos citar a las LDL oxidadas, patógenos como *Chlamydia pneumoniae* o las proteínas del choque térmico, los cuales pueden alterar las fuerzas mecánicas y el microambiente.

Como sustento de esta hipótesis, recientemente se demostró que la reducción de lípidos limitó la expresión de CD40L en ateromas experimentales. La presentación del antígeno a los linfocitos T puede proporcionar otra vía temprana que inicie la expresión de CD40L. Finalmente, el IFN $\gamma$ , una citocina expresada tempranamente durante la aterogénesis, potencialmente induce la expresión de CD40/CD40L (20). El incremento en la adhesión de células inmunocompetentes al endotelio puede estar entre las funciones proaterogénicas más tempranas mediadas por CD40/CD40L. La unión de CD40 sobre las células endoteliales induce la expresión de moléculas de adhesión a leucocitos como VCAM-1, E-selectina, e ICAM-1, mientras que la unión de CD40 sobre los macrófagos desencadena la expresión de LFA e ICAM-1. Notablemente, la estimulación con CD40L incrementa la adhesión de linfocitos T a los cultivos de células endoteliales, pero disminuye la de los neutrófilos, un tipo celular no detectado comúnmente dentro del ateroma humano no roto. La importancia de las moléculas de adhesión ha sido demostrada en modelos experimentales en los cuales la deficiencia en las moléculas de adhesión inducibles por CD40L como ICAM-1 y VCAM-1, o P/E-selectina no sólo disminuyó significativamente la adhesión de células inmunocompetentes, sino que también redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en ratones deficientes de Apo-E (25).

Además de la adhesión de los leucocitos, probablemente las interacciones CD40/CD40L en combinación con IFN $\gamma$ , promueve una respuesta inmune Th1, predominando en sitios de aterosclerosis. De hecho, las señales de CD40 parecen ser suficientes para la inducción del dominio Th1, y la supresión del dominio Th2,

respuestas inmunes in vivo e in vitro. Esta función puede involucrar la supresión de la expresión IL-4 y la inducción de la expresión IL-12 por células endoteliales, células de músculo liso y macrófagos. IL-12 dimerizado con la subunidad IL-1, detona la síntesis de IFN $\gamma$ , una citocina que no sólo promueve directamente la respuesta Th1, sino que además incrementa los niveles de CD40, sugiriendo un posible mecanismo de retroalimentación positiva. La unión del CD40 a las células asociadas al ateroma también puede inducir la expresión de IL-15. La sobreexpresión de IL-15 en ateromas humanos y experimentales, es un potente estimulador de la proliferación de los linfocitos T y es sinérgico con IL-12 en la producción de IFN $\gamma$ , probablemente vía incremento en la expresión de CD40 en monocitos y de receptor de IL-12 en linfocitos T, acentuando así, la respuesta inmune predominante de Th1. Notablemente, IL-15 incrementa la expresión de CD40L en linfocitos, ilustrando aún otra posible asa de retroalimentación positiva que puede operar en la aterogénesis. Es de notar, que las interacciones CD40/CD40L aumentan la expresión de IL-1 $\beta$  activa, una citocina pro inflamatoria abundantemente expresada en ateromas humanos, por varias vías. La unión de CD40 a las células de músculo liso y macrófagos no sólo induce la expresión del precursor de esta citocina, sino que también incrementa la formación de enzima convertidora de IL-1 $\beta$  activa (caspasa-1) necesaria para la maduración del precursor inactivo IL-1 $\beta$ . En síntesis, estos datos sugieren que las interacciones CD40/CD40L desencadenan y/o sustentan una inflamación conducida predominantemente por citocinas Th1 a través de varias vías, estableciendo así la reacción inmune característica de la aterogénesis.

Respecto al papel del CD40 en los procesos de quimioatracción involucrados en la génesis de la placa de ateroma, cabe señalar que la unión de CD40 sobre las células endoteliales, células de músculo liso, macrófagos y linfocitos T detonan la expresión y liberación de quimioatrayentes sobre expresados dentro del ateroma humano, como IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1  $\beta$ , RANTES, SDF-1, y MCP-1. Estas quimiocinas atraen y dirigen a los linfocitos T y macrófagos al ateroma, sosteniendo así la inflamación crónica. La importancia de las señales de las quimiocinas para la acumulación de linfocitos T dentro de los sitios de inflamación crónica fue sustentada por la localización in vivo de SDF-1 y su receptor CXCR-4 (modulado por señal CD40) en sinovial reumatoide humano. Además, la deficiencia de receptores de quimiocinas no solo se asoció con disminución de la migración de células inmunocompetentes, sino que también limitó la respuesta inmune mediada por Th1, probablemente mediada por deterioro en la expresión de IFN- $\gamma$ . Este proceso puede estar asociado con una disminución en la expresión de CD40, debido a que el IFN- $\gamma$  proporciona una potente inducción de CD40 en ateroma humano. De acuerdo con el papel crucial de las señales de quimiocinas en la aterogénesis, se ha demostrado que la ausencia de quimioatrayentes (p. ej. MCP-1), u otros receptores (p. ej receptor de quimiocinas C-C), disminuye significativamente la progresión de lesiones ateroscleróticas en ratones.

También se ha encontrado un papel del CD40 en la modificación de la matriz extracelular en las placas de ateroma. De acuerdo con la hipótesis de que las interacciones CD40/CD40L contribuyen a la pérdida de matriz extracelular en lesiones ateroscleróticas, la interrupción de las señales CD40 incrementó

significativamente el contenido lesional de colágeno en ateroma de ratones.

Adicionalmente, varios estudios in vivo e in vitro sugieren un papel central para las interacciones CD40/CD40L en la regulación del potencial trombótico del ateroma. La unión del CD40 sobre las células endoteliales, células de músculo liso y macrófagos induce potencialmente la expresión de factor tisular in vitro. La disminución de la expresión de trombosmodulina, el receptor "anticoagulante" para trombina por unión de CD40, sustenta un eminente papel para las interacciones CD40/CD40L en la determinación del estado procoagulante de una célula. En resumen, las interacciones CD40/CD40L median varios de los procesos en diversos estadios de la ruptura de la placa y sus secuelas clínicas. Desafortunadamente, no hay modelos experimentales disponibles de ruptura de la placa para probar directamente la relevancia de las interacciones CD40/CD40L en estos pasos finales de la aterogénesis.

Los hallazgos de que la interrupción de las interacciones CD40/CD40L conducen a que la placa adopte características de estabilidad en humanos incrementa el potencial de manipulación de esta pareja receptor/ligando como herramienta terapéutica. Esta inhibición de CD40/CD40L también se ha buscado como herramienta terapéutica en otras enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo esclerosis múltiple, nefritis lúpica, artritis y diabetes mellitus autoinmune y cáncer. Al igual que la aterosclerosis, estas enfermedades muestran una elevada expresión local de CD40L dentro de los tejidos inflamados y/o sistémicos en el suero de los pacientes afectados. La interrupción de la interacción CD40/CD40L parece ser un excelente blanco terapéutico dado que en estudios in vivo se ha

demostrado mejoría en enfermedades experimentales en animales con la administración de anticuerpos anti CD40L. El tratamiento continuo y/o sistemático, puede proporcionar una terapia clínica atractiva para aterosclerosis, una enfermedad que comúnmente se desarrolla en el transcurso de décadas. Y aunque permanece controversial si la interrupción a corto plazo del "ciclo inmunitario" puede ser suficiente para mediar los beneficios a largo plazo en aterosclerosis, recientes estudios sustentan esta última estrategia terapéutica en el contexto de otras enfermedades inmunes. Una única aplicación de anticuerpos monoclonales humanizados contra CD40L proporcionó protección contra el rechazo agudo del injerto renal. De hecho, ya se han iniciado estudios que analizan la seguridad y farmacología de los anticuerpos humanizados anti-CD40L, pero se requiere de seguimiento a largo plazo para juzgar apropiadamente el riesgo y beneficio de este tratamiento.

En contraste con la expresión de CD40 y CD40L, las vías de transducción de señal desencadenadas por esta interacción parecen diferir significativamente dentro de ciertos tipos celulares en varios estadios de activación y diferenciación. Vías de señal distintas de CD40 pueden proporcionar nuevos blancos terapéuticos permitiendo una intervención más específica en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Desafortunadamente, a la fecha, existe muy poca información acerca de las vías de señal de CD40 en las células endoteliales, células de músculo liso o macrófagos.

Como conclusión respecto al papel de la pareja CD40/CD40L en la aterosclerosis conviene resaltar dos aspectos importantes: Primero, las señales CD40 pueden

promover la expresión de mediadores proaterogénicos mal regulados por otras citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$ . Ejemplos incluyen ciertos MMPs, caspasa 1, y actividad procoagulante. Segundo, el CD40L promueve la expresión de una amplia variedad de mediadores proaterogénicos y puede ocupar una posición proximal en la cascada de citocinas implicadas en la progresión de ateroma. Es por eso que el espectro de funciones del CD40 abarca una amplia gama de acciones implicadas en la patogenia de la enfermedad, desde etapas muy tempranas de la aterogénesis hasta las complicaciones tardías como los eventos tromboembólicos agudos consecuencia de esta enfermedad. La capacidad de CD40L despertar mecanismo inflamatorios en la mayoría de las células implicadas en la aterosclerosis enfatiza su potencial papel central en esta enfermedad.

Más recientemente, las plaquetas, fueron añadidas a la lista de fuentes de CD40L. Estas células liberan ligando funcional, almacenado, presintetizado dentro de segundos después de su activación in vitro y durante la formación del trombo in vivo.

Con la activación, las plaquetas expresan CD40L en su membrana, el cual induce cambios proinflamatorios en las células endoteliales vía CD40 endotelial, como lo demuestra el estudio realizado por Henn y colaboradores(26), quienes estudiaron inicialmente a las plaquetas en reposo, siendo indetectable el CD40L en su superficie, sin embargo posterior a un minuto de su activación con un análogo de la trombina, resultó en una sobre-expresión de CD40L en la superficie plaquetaria, reflejando que la molécula se encuentra almacenada y presintetizada. Cuando se incubaron las plaquetas no estimuladas (en reposo) con las células endoteliales de

vena umbilical humanas por 4 horas, observaron una ligera sobrerregulación de las tres moléculas, reflejando probablemente una mínima preactivación de las plaquetas por el procedimiento experimental. En contraste, las plaquetas activadas por concentraciones fisiológicas de trombina humana sobre regularon substancialmente la E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 sobre las células endoteliales de cordón humanas. Esta sobrerregulación pudo ser bloqueada en gran parte por el anticuerpo específico TRAP1 (E-selectina:  $90 \pm 9\%$  s.e.m.,  $n=5$ ; VCAM-1  $71 \pm 15\%$ ,  $n=5$ ; ICAM-1  $68 \pm 7\%$ ,  $n=5$ ). Resultados similares se obtuvieron con células endoteliales arteriales humanas. En contraste con reportes previos sobre activación de células endoteliales humanas de cordón umbilical por el CD40, encontraron que con el CD40L sintético hubo una dramática sobrerregulación de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, la cual fue completamente bloqueada por TRAP1. La magnitud del efecto alcanzado con el CD40L ligado a membrana fue similar a aquellos observados con TNF- $\alpha$  (e interleucina-1), los cuales son los dos mediadores más potentes de inflamación.

Aparte de la sobre-regulación de las moléculas de adhesión, las células endoteliales reaccionan a un estímulo inflamatorio secretando varias quimiocinas incluyendo interleucina-8, el principal quimiotractor para los neutrófilos, y MCP-1, el cual recluta y activa monocitos. Ambas quimiocinas pueden ser usadas como indicadores de la reacción inflamatoria, debido a que estas no se almacenan en las plaquetas. Después de co-incubar las plaquetas con las células endoteliales de cordón umbilical humano por 4 hrs hubo una sustancial secreción de IL-8 y MCP-1. Esta secreción fue parcialmente bloqueada por TRAP1 (IL\_8:  $39 \pm 19\%$  s.e.m.,

n=5; MCP-1  $37\pm 15\%$  s.e.m., m=3), indicando que la interacción del CD40L plaquetario con CD40 sobre las células endoteliales contribuye a la secreción de ambas quimiocinas por las células endoteliales.

Las plaquetas producen efectos paracrinicos a través de la vía CD40/CD40L. Alrededor de 95% del sCD40L en el plasma es de origen plaquetario. El ligando CD40L plaquetario está sobre-expresado y el sCD40L está incrementado en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, dos enfermedades caracterizadas por inflamación crónica. Dado que las plaquetas expresan CD40, su liberación de CD40L permite que estas coactiven otras plaquetas y haya retroalimentación entre ellas mismas, aumentando la liberación de mediadores proinflamatorios (20).

La sobre-regulación de la vía CD40/CD40L promueve la progresión de aterosclerosis y puede incrementar el riesgo cardiovascular observado en diabéticos. La disfunción del endotelio observado en aterosclerosis es debida parcialmente a la activación de las células endoteliales por el sCD40L el cual correlaciona con el incremento en el CD40L soluble y ligado a membrana en la aterosclerosis. Esta carga de CD40L plaquetario añadido a la disfunción endotelial estimulan directamente a la formación de la placa. El sCD40L activa a los leucocitos y los recluta en la pared vascular, ocasionando la extravasación de células espumosas. Los diabéticos tienen incrementados los niveles de sCD40L en su plasma y tienen incrementados los niveles de CD40L en sus membranas plaquetarias. Este incremento puede ser una consecuencia de un descontrol de los niveles de glucosa séricos, debido a que la glucosa puede estimular la producción de CD40L en megacariocitos de ratones e incrementar la liberación de

sCD40L en plaquetas humanas. Así, la vía de sCD40/CD40L es otro blanco potencial para terapéutica antiplaqueta.

### **6.- Vía CD40L/sCD40L como factor de riesgo cardiovascular**

Con base en este fundamento teórico se han realizado ya varios estudios clínicos que correlacionan las concentraciones séricas de ligando CD40L soluble (sCD40L) con eventos cardiovasculares.

Heeschen y colaboradores (26) estudiaron 1265 pacientes con síndrome coronario agudo incluidos originalmente en el estudio CAPTURE, con un seguimiento total de 6 meses, subdividiendo a los pacientes en percentiles según las concentraciones séricas de sCD40L. Aunque en las primeras 24 hrs del seguimiento, las concentraciones séricas de este marcador y los eventos cardiovasculares no presentaban diferencias estadísticamente significativas, sorprendentemente en el seguimiento posterior se encontró una relación directa entre las concentraciones séricas del sCD40L y la probabilidad de muerte de causa cardiovascular.

En otra investigación, del tipo de casos y controles anidado en una cohorte, realizada en los Estados Unidos, Schönbeck y colaboradores (27) incluyeron a las participantes del estudio Women's Health Study (WHS), que originalmente evaluaba el efecto de la vitamina E y bajas dosis de aspirina como prevención primaria para eventos cardiovasculares en 28 263 mujeres americanas quienes no tenían ningún historial de enfermedad cardiovascular ni cáncer. El objetivo de esta investigación fue la evaluación de las concentraciones séricas de sCD40L como un marcador pronóstico para desarrollar en el futuro eventos cardiovasculares en sujetos sanos.

Para tal efecto las mujeres que desarrollaban infarto al miocardio no fatal, EVC o muerte de causa cardiovascular eran elegidas como casos, que posteriormente se comparaba con un control de características demográficas similares. Los niveles plasmáticos de sCD40L fueron mayores en el grupo de casos que en el de controles ( $2.86 \pm 0.35$  versus  $2.09 \pm 0.19$  ng/mL;  $\leq 0.02$ ). Cuando se estimó el riesgo relativo de desarrollar un evento cardiovascular, asombrosamente se encontró que aquellas mujeres quienes tenían las concentraciones séricas de sCD40L más altas (en la percentil 99) tenían un RR de 11.83 (IC 95% 1.50-93.0), quedando claro el mayor riesgo de enfermedad vascular entre individuos que presentan concentraciones altas de sCD40L incluso en personas sanas.

No obstante permanece incierto si las concentraciones circulantes de sCD40L representan un marcador o una consecuencia de enfermedad cardiovascular, como las elevaciones en sCD40L en esta población particular de pacientes puede ser secundaria al evento clínico (p. ej. liberación de CD40L de las plaquetas después de la formación del trombo), dándole la interpretación a las elevadas concentraciones de sCD40L como "inocentes" en este estadio del proceso de la enfermedad.

Aunque el sCD40L ha sido caracterizado como un marcador de enfermedades trombóticas, es mucho menos conocido su papel directo en la función de la plaqueta. Se ha sugerido que el CD40L es un ligando  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , un agonista plaquetario, y que contribuye a la estabilidad del trombo arterial. Inwald y colaboradores añadieron algo a la limitada información que concierne a los efectos del sCD40L en la función plaquetaria y demostraron que la unión del CD40 puede

ser un mecanismo para la activación plaquetaria. Después de la incubación de plaquetas con la forma trimérica de sCD40L (sCD40LT), y mostraron un incremento en la expresión de CD62P así como la liberación de gránulos- $\alpha$  densos. Interesantemente la presencia de un agente bloqueador de la glicoproteína IIb/IIIa no alteró la expresión de CD62P inducida por sCD40LT. Además, la  $\beta$ -trombomodulina y [ $^{14}$ C]-5-HT se encontraron presentes después de la unión reflejando liberación de gránulos- $\alpha$  y gránulos densos. Una intrigante parte de este estudio son los datos confirmatorios usando sujetos con síndrome hiper-IgM ligado al X y la ausencia conocida de expresión de CD40L. La capacidad de usar estos sujetos es particularmente interesante en estudios dependientes de plaquetas dado que la manipulación genética en cultivos celulares no es posible.

Un aspecto a considerar es la forma y concentración de sCD40L usada en los estudios. En los experimentos, la concentración de sCD40LT usada fue 1  $\mu$ g/mL aunque la activación plaquetaria estuvo presente a concentraciones tan bajas como 100 ng/mL. Aunque estas concentraciones son similares a las reportadas por la literatura para la activación de otros tipos celulares con CD40L, estas son aún mayores que los niveles reportados en pacientes (50 ng/mL). Aunque esta discrepancia puede cuestionar la relevancia clínica de los hallazgos de Inwald es posible que las concentraciones locales en áreas activas de enfermedad trombótica o inflamatoria sean aún mayores. Esto podría permitir un mecanismo dependiente de dosis para producir los efectos del sCD40L. Más allá de los estudios cinéticos y de la evaluación de las concentraciones in vivo es necesario

contestar las cuestiones respecto a la relevancia del uso de estas concentraciones usadas en estos estudios. Además, la forma trimérica de sCD40L fue usada en estos estudios y se ha encontrado que la actividad específica del sCD40L puede depender de su forma como trímero y no como monómero. Aunque el CD40L ligado a membrana puede ser trimérico, hay debate concerniente a la forma soluble. Futuros estudios, específicamente en plaquetas, pueden requerirse para clarificar estas preguntas.

En el estudio de Inwald y colaboradores, la activación de la plaqueta vía sCD40LT ocurrió en presencia de un inhibidor  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Esto parece estar en contraste a trabajos previos que demuestran que el sCD40L es un ligando  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Sin embargo, una interpretación más intrigante es que este no es sólo una nueva medida de activación plaquetaria, sino que la plaqueta puede ser activada por distintas vías en diferentes sentidos. En el estudio de Inwald, la incubación con sCD40LT resultó en una significativamente menor expresión de CD62P comparada con la activación plaquetaria con el agonista de receptor de trombina, el péptido 1-6 (SFLLRN). Además, el incremento en Pac-1 es mínimo con sCD40L comparado con SFLLRN. La diferencia en la liberación de gránulos densos también fue detectada con la estimulación del receptor de trombina conduciendo a >5 veces los niveles de [ $^{14}$ C]-5-HT comparada incubación de sCD40LT. No se encontraron resultados similares con  $\beta$ -trombomodulina y posteriores análisis de gránulos- $\alpha$  también como el efecto de otros agonistas podría ser de interés. Sin embargo, puede ser posible que en áreas de concentraciones relevantes, la presencia de sCD40L ocasione una activación selectiva y liberación de gránulos pero excluye la

formación de agregados homotípicos. Esta posibilidad está apoyada por los hallazgos de que el sCD40LT incrementa la formación de agregados plaquetas-neutrófilos que ocurre en el sentido de una mínima activación de  $\alpha_{IIb}\beta_3$  y a que las plaquetas de sujetos deficientes de CD40L se agregan normalmente. Sin embargo, en el sentido de una elevada fricción,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  puede estar involucrado conduciendo a la formación del trombo. Así, estas diferencias pueden permitir una separación parcial de los papeles trombóticos e inflamatorios de las plaquetas. A la fecha, se desconoce el mecanismo mediante el cual el sCD40L induce la cascada de activación de las plaquetas, lo que es un hecho es que las plaquetas anucleares están siendo redescubiertas como un vínculo entre la trombosis e inflamación, y se requiere de más investigación para proporcionar pistas en los mecanismos dependientes de plaquetas que conducen a la regulación vascular (19).

## **7.- Rosiglitazona**

La Rosiglitazona pertenece a un grupo de medicamentos llamados tiazolidinedionas, los cuales son utilizados para el tratamiento de la diabetes, dado que incrementan la sensibilidad a la insulina predominantemente en tejidos periféricos y han demostrado tener además efectos cardiovasculares benéficos.

En los ensayos clínicos, las tiazolidinedionas disminuyen consistentemente las concentraciones de glucosa en ayuno y posprandiales así como las concentraciones de ácidos grasos libres. Las concentraciones de insulina también disminuyen en la mayoría de los estudios.

Estos cambios indican que las tiazolidinedionas actúan como sensibilizadores de

la insulina, lo cual ha sido confirmado por mediciones directas en estudios in vivo en humanos. Por ejemplo, el tratamiento de sujetos no diabéticos o aquellos con diabetes mellitus tipo 2 durante tres a seis meses con troglitazona, rosiglitazona o pioglitazona incrementa la captura e glucosa en los tejidos periféricos. En estudios similares las tiazolidinedionas incrementan la sensibilidad hepática a la insulina (capacidad de la insulina para suprimir la producción endógena de glucosa) y la sensibilidad en el tejido adiposo (medida por la capacidad de la insulina para suprimir las concentraciones de ácidos grasos libres) (28, 29).

Los PPAR $\gamma$  son esenciales para la diferenciación y proliferación del tejido adiposo normal, así como para el almacenamiento y captura de ácidos grasos. Las tiazolidinedionas incrementan el número de adipocitos pequeños y la masa de tejido adiposo en modelos animales. Estas observaciones, adicionadas al alto nivel de expresión de PPAR $\gamma$  en tejido adiposo, han conducido a la hipótesis de que las tiazolidinedionas ejercen sus acciones sensibilizadoras a la insulina ya sea directamente o indirectamente, mediante la alteración de la liberación de adiponectina, modulando la sensibilidad de la insulina fuera del tejido adiposo. Las tiazolidinedionas promueven la captura de ácidos grasos y la almacenan en el tejido adiposo, incrementando la masa de tejido adiposo. Las tiazolidinedionas así secuestran grasa a donde esta pertenece. De manera consistente con esta hipótesis, las tiazolidinedionas disminuyen los ácidos grasos libres circulantes y el contenido de triglicéridos en el hígado, pero no en el músculo esquelético, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

El metformin incrementa la sensibilidad a la insulina en el hígado sin cambiar su

contenido de grasa en pacientes con diabetes, y las tiazolidinedionas pueden disminuir las concentraciones de insulina en ayuno sin incrementar la masa grasa en pacientes con lipodistrofia.

En ratones la delección de PPAR $\gamma$  en tejido adiposo no induce resistencia a insulina en el músculo, mientras que la delección de los PPAR $\gamma$  específicos de músculo no causa resistencia.

Tomando juntos estos datos es posible la idea de que el tejido adiposo es el sitio más importante para la acción de las tiazolidinedionas si existen cantidades normales de tejido adiposo.

Rosiglitazona y Pioglitazona están actualmente aprobados en la mayoría de los países para el tratamiento de la hiperglucemia en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ya sea como monoterapia o en combinación con sulfonilureas o metformin. En los Estados Unidos también han sido aprobados para su uso en combinación con insulina, si se siguen ciertas precauciones.

Los estudios controlados sugieren que tanto la pioglitazona como la rosiglitazona son moderadamente efectivos en alcanzar el control glucémico. A dosis máximas, estos dos fármacos disminuyen la hemoglobina glucosilada en 1 a 1.5%. Así, en un paciente típico con diabetes mellitus tipo 2 uno puede esperar que la hemoglobina glucosilada disminuya de un valor de 8.5% a 7%. No se conocen las características que debe tener el paciente para predecir una buena respuesta al tratamiento, y no hay datos que sustenten el mantenimiento del control glucémico a largo plazo comparado con otras terapias existentes (30, 31).

Recientemente se generó una gran controversia sobre el empleo de Rosiglitazona

en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Esto último debido a un meta-análisis publicado por el Dr. Nissen y Wolski (32), en donde analizaron los resultados de 42 ensayos clínicos que incluyeron 15, 565 pacientes tratados con Rosiglitazona y 12, 282 asignados al grupo control. En sus resultados encontraron una razón de momios para desarrollo de infarto de 1.43 en el grupo de rosiglitazona (IC 95% 1.03 a 1.98; P=0.03) y la OR para muerte cardiovascular en el grupo de Rosiglitazona fue de 1.64 (IC 95% 0,98 a 2.74;P=0.06). Sin embargo este meta-análisis ha sido ampliamente criticado, principalmente por las siguientes razones:

- 1) El análisis estadístico empleado (método de Peto) ha sido validado previamente y se ha observado que es útil cuando el número de individuos a analizar es equivalente en ambos grupos, y si observamos la distribución de pacientes en el meta-análisis del Dr. Nissen existe una diferencia de más de tres mil pacientes entre ambos grupos, incluso, al utilizar un método estadístico diferente al empleado por los autores, sin modificar los datos originales que ellos ocuparon, se observa que los intervalos de confianza pierden significancia estadística.
- 2) Excluyeron a los ensayos clínicos que reportaron cero eventos cardiovasculares en ambos grupos, simplemente porque el método de Peto los elimina por de foul, y es bien sabido que al excluir los eventos ensayos clínicos donde la tasa de eventos es de cero puede magnificar enormemente la tasa de algún desenlace determinado.
- 3) Incluyeron ensayos clínicos que incluían pacientes con insuficiencia cardiaca, entidad en la que se conoce que no deben prescribirse tiazolidinedionas por el efecto secundario de retención hídrica y agravamiento de la clase funcional. Casualmente, esos pacientes fueron los que mostraron la

mayor tasa muerte cardiovascular (33,34).

Posterior a la publicación de este meta-análisis, se dieron a conocer los resultados preliminares de un ensayo clínico aleatorizado, realizado en 338 hospitales en 23 países de Europa y Australia. En dicho estudio donde se incluyeron un total de 2220 pacientes aleatorizados a recibir Rosiglitazona y otros 2227 pacientes a recibir Metformin. La variable desenlace a comparar entre los grupos fue hospitalización por infarto al miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, EVC, angina inestable, AIT, revascularización cardiaca no planeada, amputación de extremidades, o cualquier otra razón cardiovascular). Los resultados no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, Razón de Riesgo 1.11 (IC 95%, 0.93 a 1.32).

Al analizar los resultados de muerte cardiovascular, tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa, Razón de Riesgo 0.8 (IC 95% 0.52 a 1.24) al igual que para infarto al miocardio, HR 1.23 (IC 95% 0.81 a 1.86).(35)

Posterior al análisis de los resultados se concluyó que no existían datos suficientes para argumentar que existiera un mayor riesgo de infarto al miocardio con el empleo de Rosiglitazona.

Con los datos mostrados se decidió la permanencia de la Roasiglitazona en el mercado bajo una estrecha vigilancia farmacológica. (36)

## **9.- CD40L plaquetario y agonistas de PPAR $\gamma$**

Recientemente se ha demostrado que las plaquetas, a pesar de ser fragmentos de células anucleadas, contienen en su citoplasma el receptor PPAR $\gamma$ . Se ha

observado además que los agonistas del receptor PPAR $\gamma$ , pueden disminuir la activación plaquetaria y la liberación del sCD40L. (37)

Con este conocimiento Marx, realizó un estudio con 40 pacientes diabéticos y con cardiopatía isquémica demostrada por medio de angiografía, adicionándoles Rosiglitazona a su tratamiento antidiabético. Rosiglitazona redujo significativamente las concentraciones de sCD40L dentro de las primeras 2 semanas en 8.1% (17.1 a -32.7) ( $P < 0.05$  comparada con la línea basal), además disminuyó 18.4% (-5.0 a -33.1) después de 6 semanas ( $P < 0.05$ , comparado con la línea basal), y a un 27.5% (8.2 a -70.5) después de 12 semanas ( $P < 0.05$  comparada con la línea basal y con 2 semanas de tratamiento). No se demostró efecto en el grupo placebo (38).

Sin embargo, en este estudio únicamente se valoran las concentraciones séricas de sCD40L, sin estudiar a la plaqueta directamente.

Con base en lo expuesto previamente nos propusimos realizar un ensayo clínico controlado aleatorizado comparando los efectos de Rosiglitazona sobre la expresión de CD40L tanto en la superficie plaquetaria como en su forma soluble, además de evaluar la consecuencia, como lo son la sobre-expresión y por lo tanto el incremento en las formas solubles de las moléculas de adhesión celular endoteliales ICAM-1 y VCAM-1 en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

### 3. JUSTIFICACION

La Diabetes Mellitus tipo 2 es una enfermedad altamente prevalente, constituyendo actualmente un problema de salud pública nivel mundial. Se estima que en México existen aproximadamente 2.8 millones de personas con Diabetes Mellitus.

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen un incremento en el riesgo de desarrollar aterosclerosis con los resultantes, angina de pecho, Evento Vascular Cerebral y síndromes coronarios agudos. Como consecuencia 70% a 80% de los diabéticos mueren de un evento trombótico.

Las plaquetas son células anucleadas que recientemente han emergido como un importante contribuidor para el inicio y la progresión de la aterosclerosis. De los mecanismos de activación plaquetaria, la interacción del ligando CD40 (o CD154) con su receptor CD40 han mostrado estar íntimamente involucrados en el proceso inflamatorio en la pared del vaso, debido a que activa a las células endoteliales ocasionando la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, esto a su vez favorece el reclutamiento y migración de células inflamatorias en la pared vascular iniciando y perpetuando el desarrollo de la placa de aterosclerosis. Por lo anterior, el CD40L plaquetario se postula como un blanco terapéutico potencial para modular la inflamación vascular y así posiblemente influenciar en el riesgo cardiovascular.

La principal fuente de sCD40L son las plaquetas. La interrupción de la vía CD40/CD40L se ha sugerido como una opción para reducir el fenómeno de aterosclerosis. Los agonistas del receptor PPAR $\gamma$  han demostrado disminuir las

concentraciones séricas de sCD40L y sin que hasta el momento se haya estudiado su influencia directamente en la expresión en la superficie plaquetaria.

Por lo tanto proponemos un ensayo clínico controlado para investigar el efecto del tratamiento con Rosiglitazona en la expresión del ligando CD40 sobre la superficie plaquetaria y en las concentraciones plasmáticas de CD40 soluble, así como en las formas solubles de las moléculas de adhesión vasculares ICAM-1 y VCAM-1 en pacientes diabéticos tipo 2.

#### 4. HIPOTESIS

El tratamiento con Rosiglitazona disminuye la expresión del ligando CD40 en la superficie plaquetaria, al mismo tiempo reduce las concentraciones séricas de las moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1 y VCAM-1 en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto del tratamiento con Rosiglitazona en la expresión del ligando CD40 en la superficie plaquetaria en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2

### 5.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

Evaluar el efecto del tratamiento con Rosiglitazona en las concentraciones séricas de la forma soluble de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

Evaluar el efecto del tratamiento con Rosiglitazona en las concentraciones séricas de la forma soluble de la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1. Tipo de Estudio

Se trata de un estudio analítico, longitudinal, prospectivo y experimental.

Con diseño de Ensayo Clínico Aleatorizado Controlado de Grupos Paralelos

### 6.2. Ubicación Temporal y Espacial

El estudio fue realizado en el departamento de Medicina Interna del Hospital de Especialidades en la Unidad Médica de Alta Especialidad Centro Médico Nacional “La Raza”. En el periodo comprendido entre agosto 2007 y octubre 2008, se capturaron pacientes de la consulta externa de medicina interna en el Hospital de Especialidades CMNR así como una la unidad de Medicina Familiar # 20 IMSS. El proyecto fue aprobado por el comité local de ética e investigación en cada una de las instituciones y los pacientes participantes firmaron consentimiento informado.

### 6.3. Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión

- Pacientes con diabetes mellitus tipo 2
- Sexo masculino o femenino
- Mayores de 18 años de edad
- Derechohabientes del IMSS
- Consentimiento informado por escrito
- En tratamiento con Metformina, ya sea como monoterapia o en combinación con Glibenclamida.
- Glucosa sérica menor de 200 mg/dL

#### Criterios de no Inclusión

- En tratamiento actual o previo con alguna tiazolidinediona
- Cardiopatía isquémica: Angina crónica estable, Angina inestable o infarto del miocardio durante las 4 semanas previas
- Daño en la función hepática ( $\geq 2.5$  veces el valor normal)
- Insuficiencia Cardíaca Congestiva CF III o IV de la NYHA
- Insuficiencia renal con depuración de creatinina  $< 30$  ml/min
- Neoplasias
- Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
- Cirugía mayor reciente en las 2 semanas previas
- En tratamiento con cualquier tipo de insulina o sus análogos.
- Tratamiento con más de dos fármacos hipoglucemiantes.

#### Criterios de Exclusión

- Presencia de toxicidad hepática relacionada con la ingesta de Rosiglitazona
- Desarrollo de Hipersensibilidad a los componentes de la fórmula
- Que durante el tiempo en que se desarrolle el estudio presente un evento de Síndrome Coronario Agudo, sintomatología de Insuficiencia Cardíaca Evento Vascular Cerebral o Tromboembolismo Pulmonar
- Muerte

#### Criterios de Eliminación

- Retiro de Consentimiento Informado

## 6.4. Variables

### Variable Independiente

#### Tratamiento con Rosiglitazona.

**Definición operativa:** Dosis de 4 mg de Rosiglitazona dos veces al día por vía oral en tabletas de 4mg por 12 semanas

**Categoría:** Cualitativa (Si/No)

**Escala de medición:** Nominal dicotómica

**Unidad de medición:** mg/dosis por número de días.

### Variables Dependientes

Expresión del ligando CD40 plaquetario (CD40L).

**Definición operativa:** Medición de CD40L por Citometría de Flujo

**Categoría:** Cuantitativa continua

**Escala de medición:** Numérica continua

**Unidades de medición:** porcentaje de plaquetas con expresión de CD40L en su superficie

#### Concentraciones séricas de VCAM-1 soluble

**Definición operativa:** Niveles séricos de VCAM-1 soluble medida por ensayo enzimático estandarizado inmunoabsorbente para VCAM-1

**Categoría:** Cuantitativa continua

**Escala de medición:** Numérica continua

**Unidades de medición:** pg o ng/ml

#### Concentraciones séricas de ICAM-1 soluble

**Definición operativa:** Niveles séricos de ICAM-1 soluble medida por ensayo enzimático estandarizado inmunoabsorbente para ICAM-1

**Categoría:** Cuantitativa continua

**Escala de medición:** Numérica continua

**Unidades de medición:** pg o ng/ml

## VARIABLES CONFUSORAS

### **Hipercolesterolemia**

**Definición operativa:** Niveles de colesterol mayores a 240 mg/dL

**Categoría:** Cualitativa (SI/No)

**Escala de medición:** Nominal dicotómica

**Unidades de medición:** mg/dL

**Estrategia de Control:** Pareamiento

### **Tratamiento previo con estatinas**

**Definición operativa:** Tratamiento con algún fármaco de la familia de las estatinas

**Categoría:** Cualitativa

**Escala de medición:** Nominal dicotómica

**Unidades de medición:** Si/No

**Estrategia de Control:** Eliminación

### **Hiperglucemia**

**Definición Operativa:** Glucosa sérica mayor a 200 mg/dl

**Categoría:** Cualitativa

**Escala de Medición:** Nominal dicotómica

**Unidad de Medición:** Si/No

**Estrategia de Control:** Eliminación

### **Tratamiento Combinado**

**Definición Operativa:** Que se encuentre en tratamiento con Metformina y un Secretagogo:

**Categoría:** Cualitativa

**Escala de Medición:** Nominal dicotómica

**Unidad de medición:** SI/NO

**Estrategia de control:** Pareamiento

## 6.5 Tamaño de la Muestra

Se realizó el cálculo de tamaño de la muestra mediante la fórmula de diferencia de proporciones para variable cualitativa, debido a que en el único trabajo donde se observa el efecto de la Rosiglitazona sobre el sCD40L los datos aportados no permiten obtener varianza, ni se expresan las cifras absolutas de las concentraciones séricas del mismo, unicamente se describe el porcentaje de descenso en los pacientes tratados.

$$n = 19$$

$$n = \frac{[Z\alpha\sqrt{2 \cdot P \cdot (1-P)} + Z\beta\sqrt{P1 \cdot (1-P1) + P2(1-P2)}]^2}{(P1-P2)^2}$$

Donde:

n= sujetos necesarios en cada uno de los grupos

Z $\alpha$ = significancia estadística de 0.05= 1.960

Z $\beta$ = potencia del 80% = 0.842

P1= Valor de la proporción en el grupo de tratamiento habitual= 0

P2= Valor de la proporción en el grupo de intervención= 0.28

P= Media de las dos proporciones P1 y P2 = 0.14

15% de pérdidas

## **6.6. Métodos de Laboratorio**

### **Medición de CD40L plaquetario**

Se toma una muestra de sangre en un tubo de ensaye con anticoagulante. La muestra se centrifuga 20 segundos a 14,000 revoluciones por minuto (RPM) para separar el plasma del sedimento de células. Una vez separado el plasma, en el sedimento de células se agrega 1 ml de buffer para lisis de eritrocitos y se coloca en agitador eléctrico y se agrega además una solución de fosfatos (PBS) para evitar la lisis celular. Se vuelve a centrifugar a 14,000 RPM y se repite el proceso cuantas veces sea necesario hasta separar completamente las plaquetas. Una vez separadas las plaquetas se les agrega 150  $\mu$ l de PBS y la solución se divide en 4 tubos de ensaye diferentes, depositando 25  $\mu$ l en cada uno. Después se les agrega el reactivo con el anticuerpo dirigido a la molécula que se desea marcar:

Al primer tubo se le agrega 1.5  $\mu$ l de CD40 (Santa Cruz Biotechnology), al segundo 2  $\mu$ l de CD40L (BD Biosciences Pharmingen), al tercero 1  $\mu$ l Glucoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa de Biodesign International) para usarlo como control positivo y al último no se le añade ningún anticuerpo para usarlo como control negativo. Una vez marcadas las plaquetas se dejan incubando durante 30 minutos. Posteriormente se lavan con 975 ml de PBS + Heparina y se centrifugan 20 segundos a 14,000 RPM. Ya centrifugadas se retira el sobrenadante y se resuspenden en 1 ml de solución. Una vez hecho esto último se procede a realizar la lectura en el citómetro de flujo (FACS).

## **ELISA para ICAM-1 y VCAM-1**

La técnica ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente. Básicamente esta técnica consta de las siguientes fases: 1) la conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima. 2) Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas. 3) Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno. 4) Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría. Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA.

### **6.7. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico se realizó con la estrategia de intención de tratamiento. Se utilizó además las siguientes pruebas estadísticas.

- Análisis descriptivo. Distribución de frecuencias, media, mediana de acuerdo a la escala de medición de las variables
- Análisis bivariado. Prueba de t para grupos independientes para comparar las concentraciones séricas de CD40L soluble, CD40L plaquetario, ICAM-1 y VCAM-1 antes y después del tratamiento experimental entre ambos grupos.

## 6.8. Descripción Operativa del Estudio

Una vez aprobado el estudio, se acudió a la consulta externa de medicina interna del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza” así como a la consulta externa de Medicina Familiar en la UMF #20 del IMSS.

Se seleccionaron a los pacientes diabéticos tipo 2 que se encontraban en tratamiento con Metformin ya sea en forma de monoterapia o como terapia combinada con Glibenclamida, y que reunieron los criterios de selección.

Posteriormente se aleatorizaron a dos grupos: 1) grupo de Rosiglitazona y 2) Grupo de Metformina.

A los pacientes asignados al grupo de Rosiglitazona se les sustituyó el tratamiento de Metformin por Rosiglitazona. Ya sea que se encontraran en monoterapia o en tratamiento combinado con Glibenclamida, de la siguiente manera:

Metformina en monoterapia      \_\_\_\_\_ → Rosiglitazona en monoterapia  
 Metformina + Glibenclamida      \_\_\_\_\_ → Rosiglitazona + Glibenclamida

Los pacientes que fueron asignados al grupo de Metformin continuaron con su tratamiento sin cambios.

A los pacientes se les continuó el seguimiento en la consulta externa de Medicina Interna en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza” inicialmente a la apertura de su expediente clínico y tomas basales y posteriormente con una frecuencia mensual para toma de muestras de sangre y evaluación de su estado de salud.

Al término del seguimiento se les otorgó una hoja de contra-referencia para que continuaran el tratamiento en su unidad de adscripción con las recomendaciones

terapéuticas correspondientes.

A todos pacientes se les hicieron mediciones basales de CD40L plaquetario y de las moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1 y VCAM-1 y posteriormente cada mes durante tres meses.

Además se realizaron otros exámenes de sangre entre los cuales se incluyeron citometría hemática completa (BHC), química sanguínea (QS) que comprenderá glucosa, urea, creatinina y ácido úrico; pruebas de función hepática (PFHs) albúmina, colesterol, aminotransferasa aspártica (AST), aminotransferasa de alanina (ALT), fosfatasa alcalina (FA) y gamma-glutamil transpeptidasa (GGT).

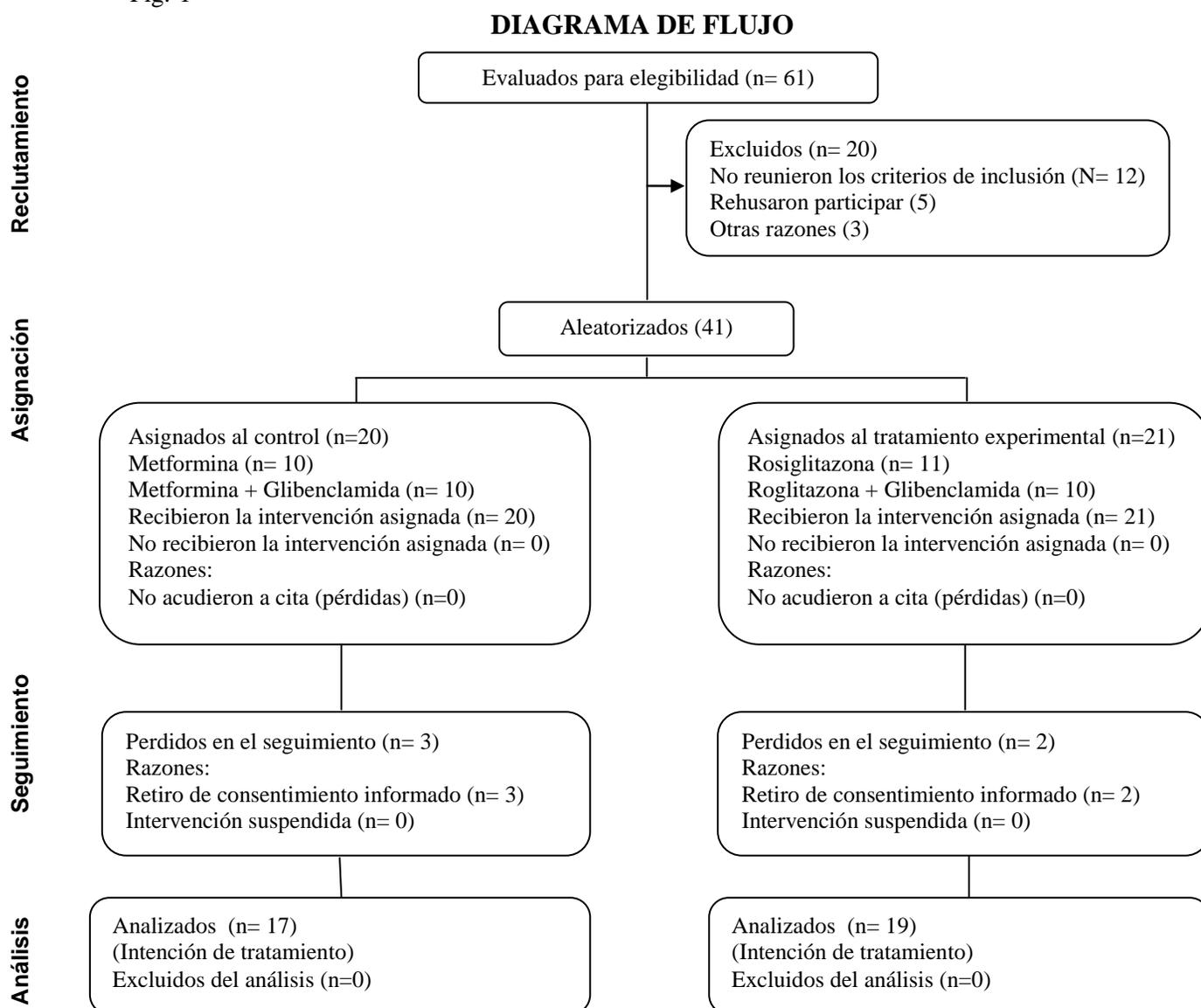
Se realizó la evaluación del paciente en su visita inicial, se explicó detalladamente en que consistía el estudio al igual que los efectos adversos de los medicamentos y el número de tomas de muestras que se requerían durante el estudio y se solicitó consentimiento informado por escrito.

En cada cita al paciente se le realizó un interrogatorio acerca de su estado general y se buscó inducidamente síntomas correspondientes a efectos adversos del fármaco. Se registraron sus signos vitales y se efectuó una exploración física general; posterior a esto se procedió a realizar la toma de muestra con 10 ml de sangre para análisis de las pruebas de laboratorio. Posterior al seguimiento de los pacientes se procedió a realizar el contraste estadístico entre las variables dependientes en cada uno de los grupos.

## 7. RESULTADOS

En el periodo comprendido de Marzo a Julio 2008 se evaluaron un total de 61 pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2, de los cuales, 20 fueron excluidos en la evaluación inicial: 12 de ellos por no reunir los criterios de selección, otros 5 rehusaron participar y los 3 restantes por diversas razones personales ajenas a su enfermedad (fig-1).

Fig.-1



Finalmente un total de 41 pacientes diabéticos tipo 2 con una edad media ( $\pm$ DE) de 58.77  $\pm$ 10.3 años y un tiempo de evolución de la enfermedad desde su diagnóstico de 8.3  $\pm$  7.7 años, fueron aleatoriamente asignados a dos grupos de estudio: Grupo de Metformina (20 pacientes) o Grupo de Rosiglitazona (21 pacientes). (Tabla-1).

<b>Tabla-1 Características basales de los pacientes</b>			
Variable	Grupo Metformin (n=20)	Grupo Rosiglitazona (n=21)	Valor p
Sexo Femenino —no(%)	11 (26)	16 (39)	0.13
Sexo Masculino—no(%)	9 (21)	5 (12)	0.13
Edad—años	63	55	0.019
Monoterapia—no(%)	10 (24)	11 (26)	0.91
Terapia combinada			
con Sulfonilurea —no (%)	10 (24)	10 (24)	0.88
Tiempo del diagnóstico—años	8.4 $\pm$ 8.1	8.5 $\pm$ 7.6	0.97
IMC	29.32 $\pm$ 4.4	30.18 $\pm$ 4.5	0.57
Glucosa plasmática en ayuno — mg/dL	176 $\pm$ 18	184 $\pm$ 13	0.12
Hipertensión —no(%)	8 (20)	10 (24)	0.53
Dislipidemia—no(%)	5 (12)	5 (12)	0.90
Tabaquismo —no(%)	3 (7)	2 (4)	0.81
Historia de tabaquismo—no(%)	0 (0)	2 (4)	
Fumador activo—no(%)	3 (7)	0 (0)	

En el grupo de Metformina se encuentran 11 mujeres (26%) y 9 hombres (21%) y en el grupo de Rosiglitazona 16 mujeres (39 %) y 5 hombres (12 %) Figura- 2.

De un total de 20 pacientes en el grupo de Metformina, 10 se encuentran en Monoterapia (50%) y 10 (50 %) se encuentran recibiendo además Glibenclamida como terapia complementaria. De un total de 21 pacientes en el grupo de Rosiglitazona 11 pacientes (52%) tienen monoterapia y 10 (48%) reciben además Glibenclamida. Figura-3.

Figura.- 2

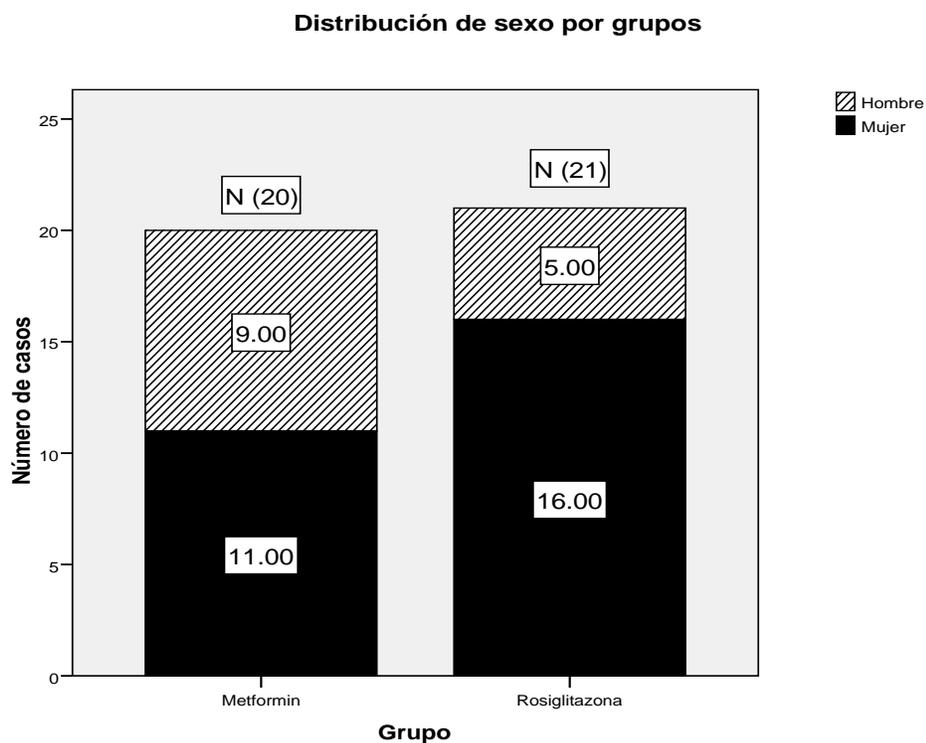
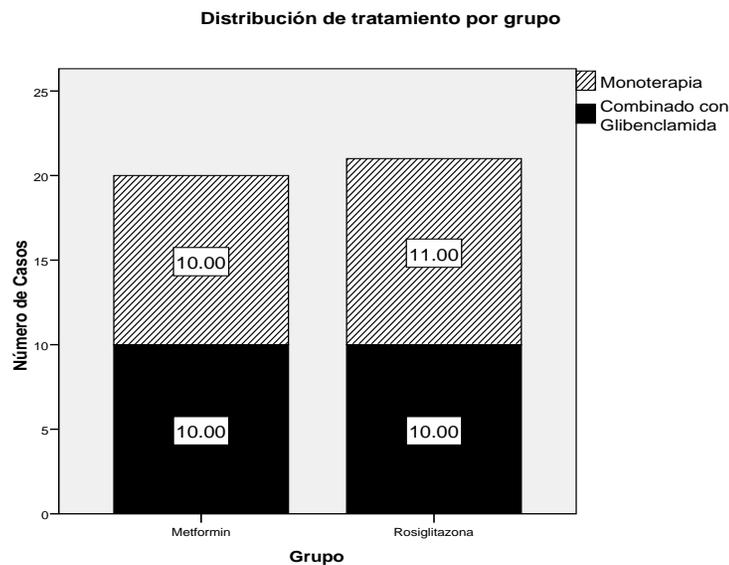
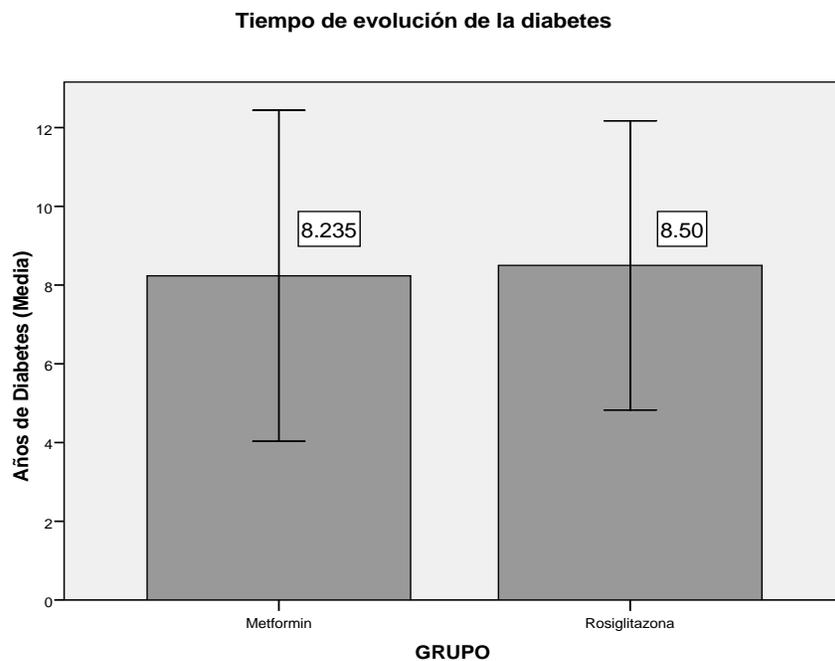


Figura.- 3



El tiempo de evolución de la enfermedad en ambos grupos es muy similar  $8.23 \pm 8.17$  años para el grupo de Metformina y  $8.50 \pm 7.62$  años para Rosiglitazona ( $p=0.97$ ). Figura - 4.

Figura.- 4 Tiempo de evolución de la DM2 en los grupos de tratamiento



La única variable demográfica que mostró significancia estadística fue la edad, siendo la media de  $63.0 \pm 9.9$  años en el grupo de Metformina Vs  $55.00 \pm 9.4$  años en el grupo de Rosiglitazona ( $p=0.01$ ). (Figura-5). El índice de masa corporal en ambos grupos fue similar:  $29.32 \pm 4.4$   $\text{kg/m}^2$  para Metformina Vs  $30.18 \pm 4.5$   $\text{kg/m}^2$  para Rosiglitazona ( $p=0.57$ ). (Figura.- 6)

Figura.- 5

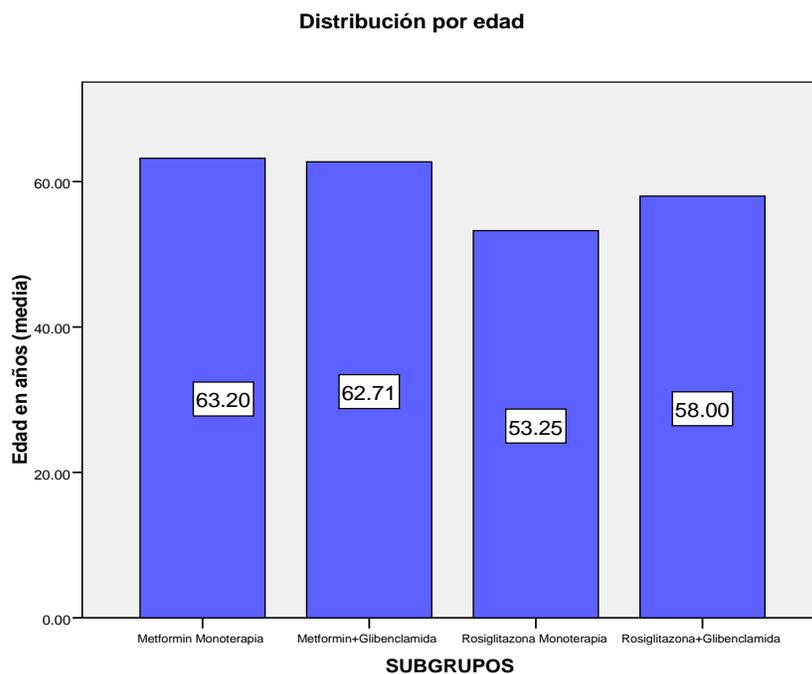
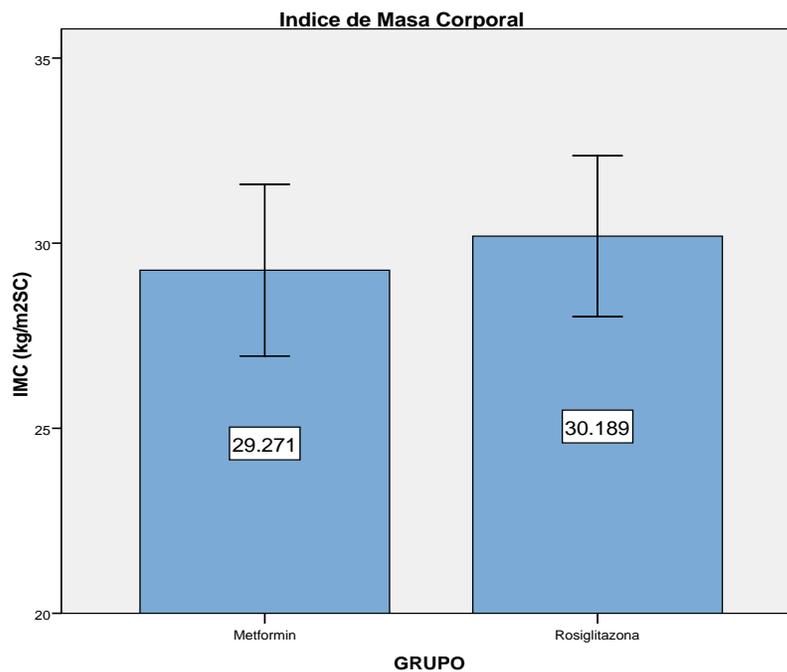
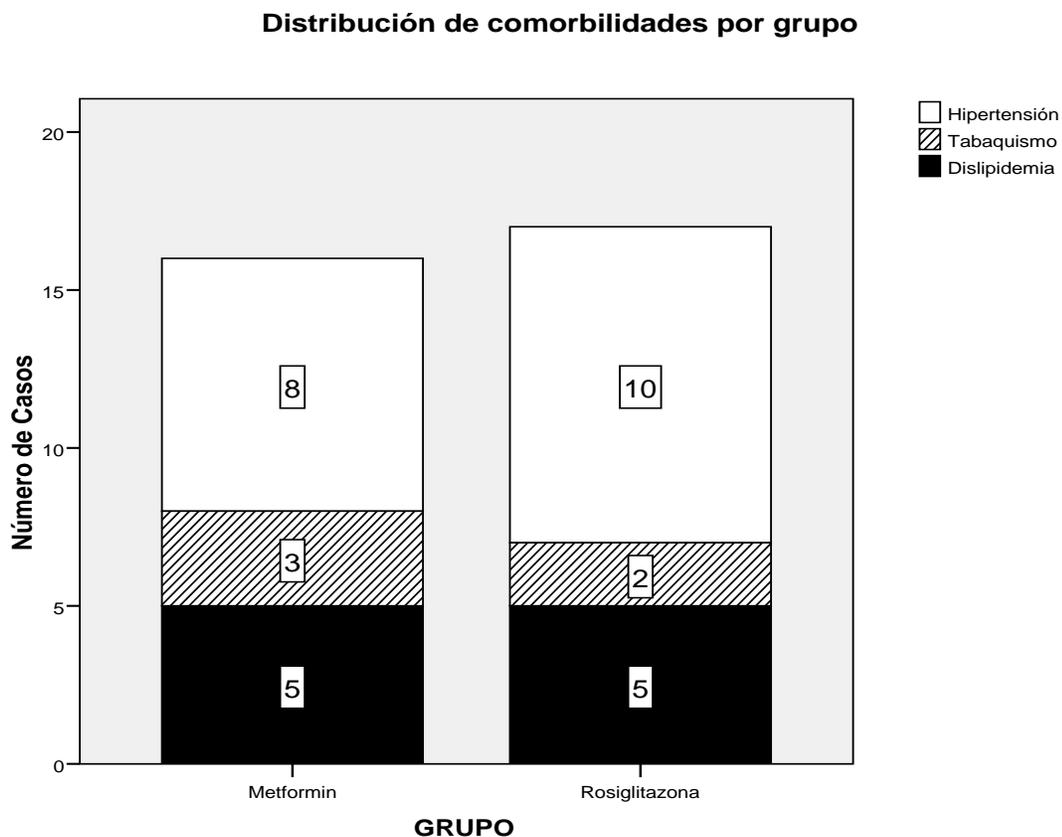


Figura 6.- IMC en los grupos de tratamiento



En cuanto a comorbilidades, existen 10 pacientes en cada grupo con hipertensión arterial esencial (54% en Metformin Vs 52% en Rosiglitazona  $p > 0.05$ ), y 5 pacientes en cada grupo con Dislipidemia (22% Vs 21%  $p > 0.05$ ). Respecto a la exposición a tabaco, hay 3 pacientes (13%) con tabaquismo activo y ninguno con historia previa de tabaquismo en el brazo de Metformina Vs cero pacientes con tabaquismo activo pero 2 pacientes (8%) con antecedente previo de tabaquismo ( $p > 0.05$ ) en el brazo de Rosiglitazona. Figura-7.

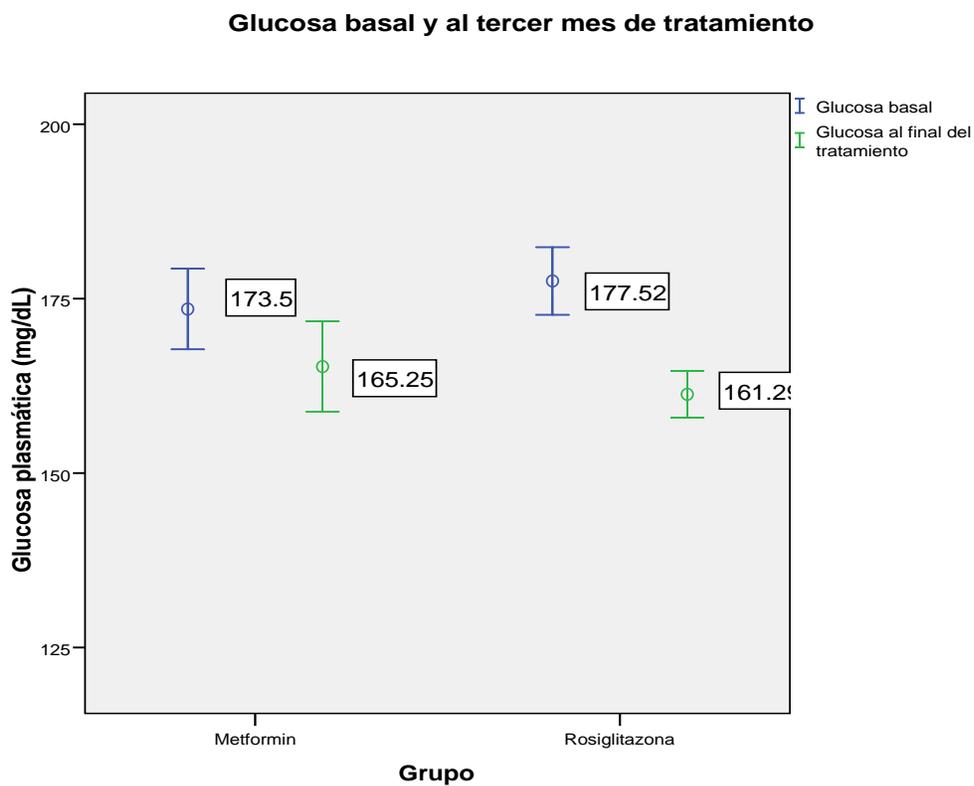
**Figura 7.- Comorbilidades**



La glucosa en ayuno no difirió significativamente en ninguno de los dos grupos, siendo al inicio del estudio de  $173 \pm 12$  mg/dL para Metformina y de  $177 \pm 10$  para Rosiglitazona. ( $p = 0.27$ )

A 12 semanas de seguimiento la glucosa fue de  $165 \pm 13$  en el grupo de Metformina y  $161 \text{ mg/dL} \pm 7$  en el grupo de Rosiglitazona ( $p = 0.25$ ). Fig.8

**Figura 8.- Glucosa Plasmáticas basal y a 12 semanas del tratamiento**



Durante el desarrollo del proyecto, en la fase de seguimiento sufrimos de 5 pérdidas en total, estas estuvieron distribuidas de la siguiente manera: 2 sujetos en el grupo de Metformin Monoterapia y 1 en el grupo de Metformin + Glibenclamida, 2 sujetos en el grupo de Rosiglitazona Monoterapia y ninguno en el grupo de Rosiglitazona + Glibenclamida (Figura.- 9)

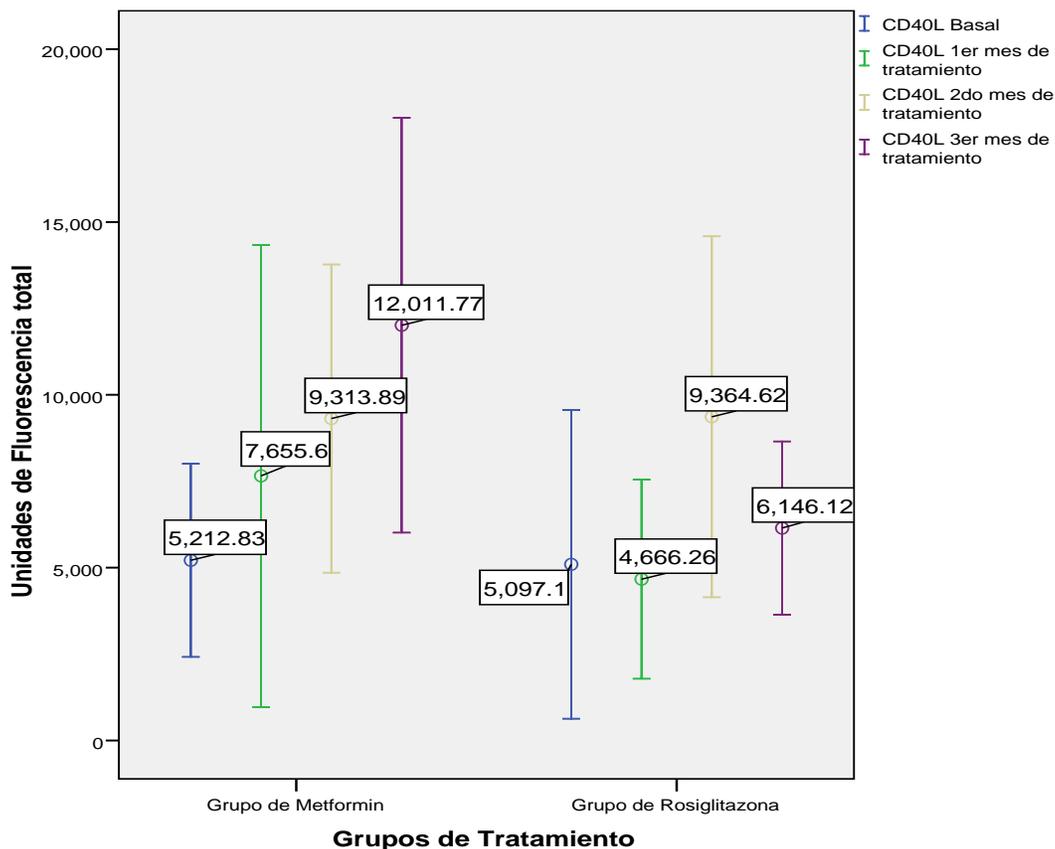
El total de las pérdidas se debieron a una poca colaboración de los paciente para realizar los trámites administrativos para poder recibir consulta en el Hospital de Especialidades y para acudir a sus citas mensuales.

## PUNTO FINAL PRIMARIO

### Expresión de CD40L en la membrana plaquetaria

Al inicio del tratamiento las concentraciones de CD40L plaquetario fueron homogéneas entre los dos grupos de tratamiento, siendo de  $5212 \pm 4600$  UFT para el Metformin y de  $5097 \pm 8335$  UFT para la Rosiglitazona ( $p= 0.89$ ), a las 4, 8 y 12 semanas de tratamiento las concentraciones en los grupos se comportaron de la siguiente manera:  $7655 \pm 7655$  UFT Vs  $4666 \pm 5598$  UFT ( $p= 0.38$ ) a las 4 semanas,  $9313 \pm 7720$  Vs  $9364 \pm 10152$  ( $p=0.98$ ) a las 8 semanas, y de  $12011 \pm 10390$  Vs  $6146 \pm 4878$  UFT ( $p= 0.04$ ) a las 12 semanas. (Figura.- 10)

**Figura.- 10** Expresión de CD40L plaquetario basal, a las semanas 4, 8, y 12 de tratamiento en los grupos de estudio



Al realizar un análisis por subgrupos, observamos que el mayor impacto en el tratamiento se presentó en los grupos de monoterapia. (Figura.- 11)

De manera basal la expresión del CD40L plaquetario en los grupos de monoterapia fue de  $5280 \pm 4803$  UFT para Metformin y  $4993 \pm 9036$  UFT para el grupo de Rosiglitazona ( $p= 0.98$ ), posterior a 4 semanas de tratamiento la expresión de CD40L fue  $9918 \pm 14862$  UFT Vs  $4428 \pm 5502$  UFT ( $p= 0.29$ ), a 8 semanas de tratamiento encontramos  $11036 \pm 9794$  UFT Vs  $4433 \pm 3449$  UFT ( $p= 0.06$ ) y al final de las 12 semanas la diferencia en la expresión de CD40L entre los dos grupos de estudio fue estadísticamente significativa:  $15116 \pm 12587$  UFT Vs  $4082 \pm 1273$  UFT, lo cual implica una reducción del 18% en la expresión del CD40L plaquetario ( $p= 0.01$ ). (Figura.- 12 y Figura.- 13)

Al comparar la expresión de CD40L en los grupos de terapia combinada, no hubo diferencia estadísticamente significativa de manera basal entre los grupo de Metformin + Glibenclamida y entre el de Rosiglitazona + Glibenclamida (  $5122 \pm 4658$  Vs  $5245 \pm 7660$ ,  $p= 0.84$ ), así como al final de las doce semanas de tratamiento ( $7872 \pm 4784$  Vs  $9094 \pm 4681$ ,  $p= 0.65$ ). (Figura.- 14)

Figura.-11 Expresión de CD40L plaquetario al inicio y a las 4, 8 y 12 semanas de tratamiento en los 4 subgrupos.

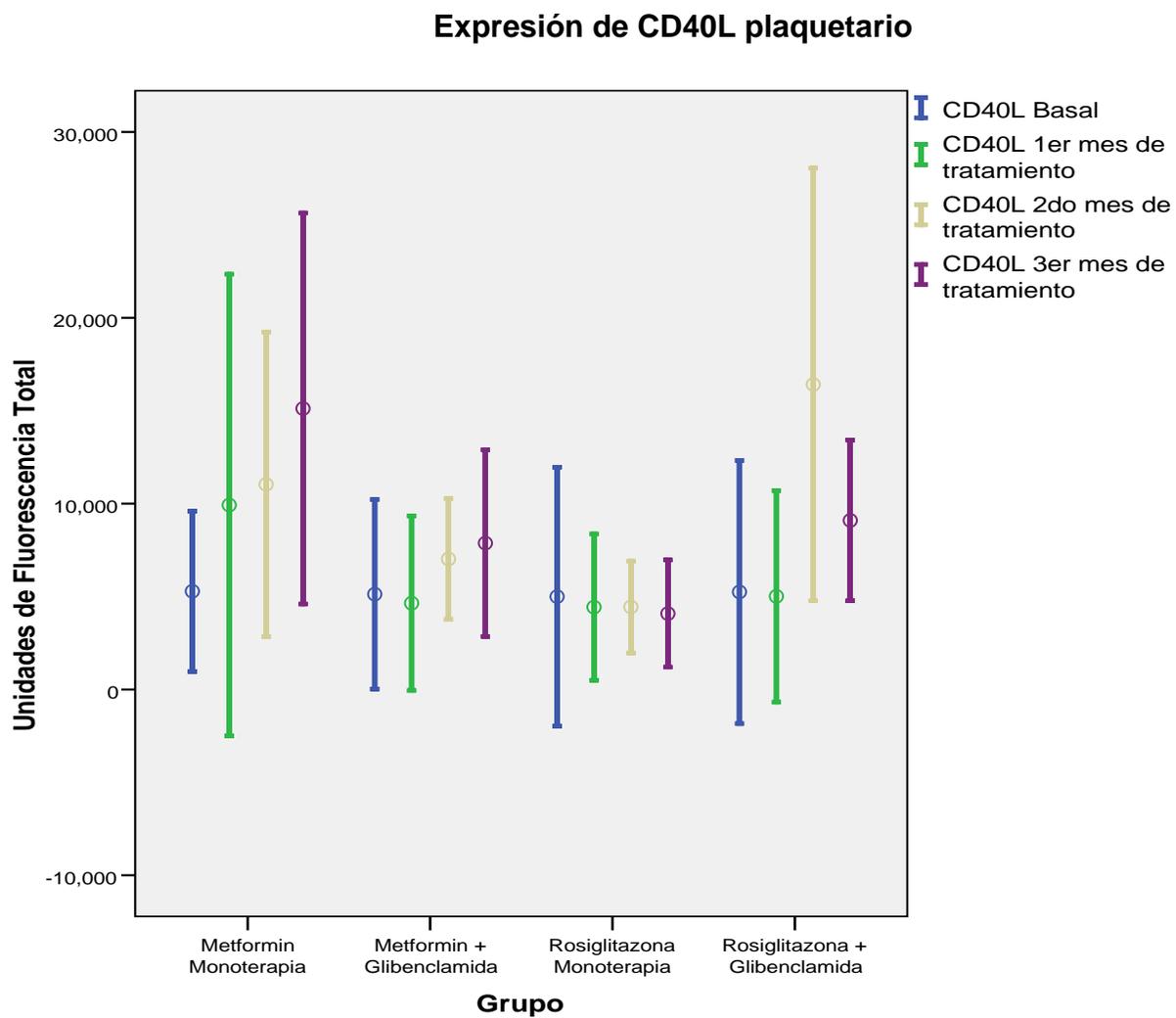


Figura.- 12 Expresión de CD40L plaquetario durante las 12 semanas de tratamiento en los grupos de Monoterapia

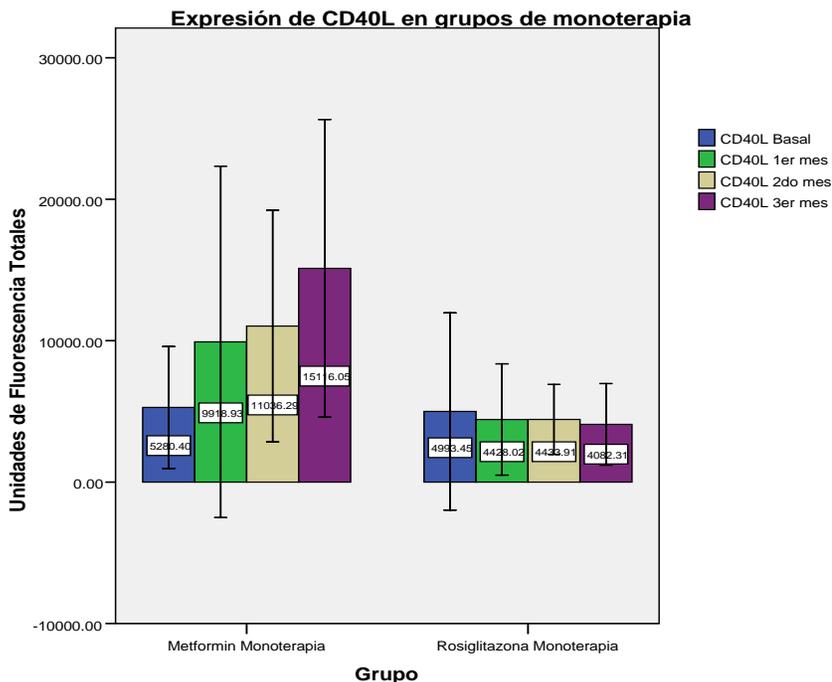


Figura.-13 Expresión de CD40L al inicio y al final del tratamiento en grupo de monoterapia

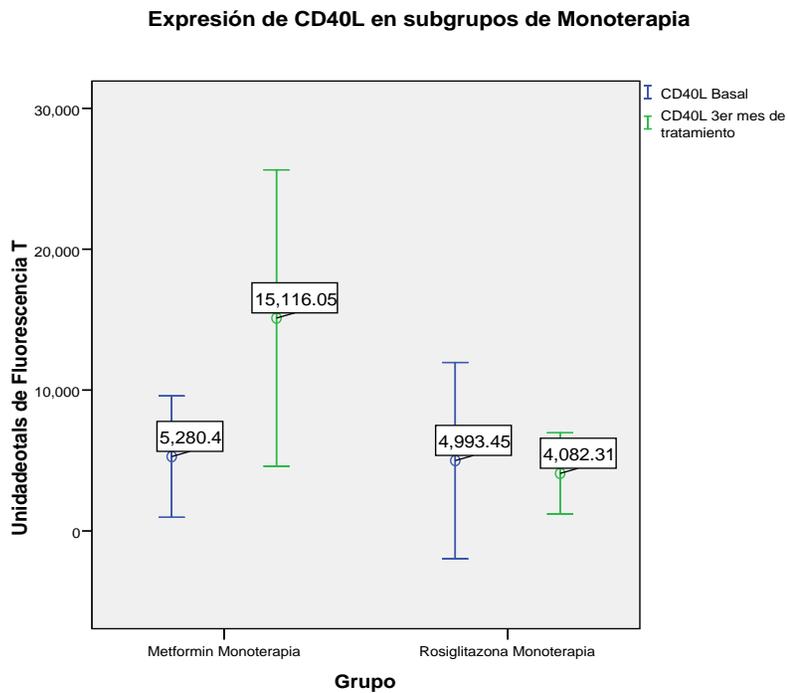
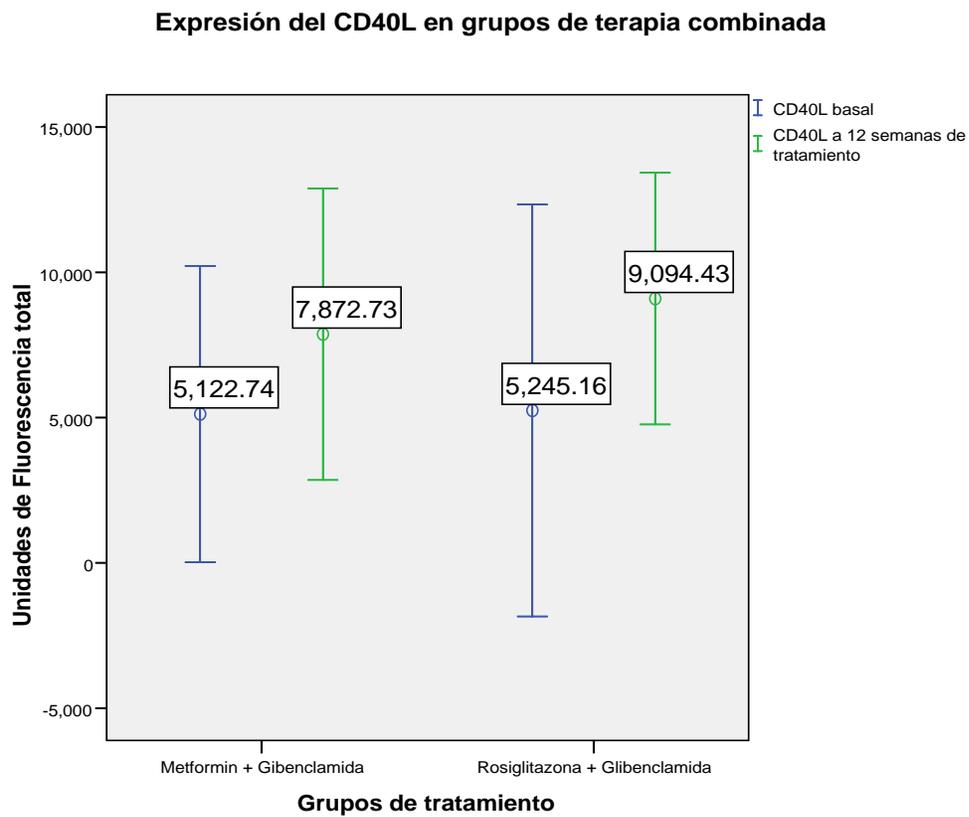


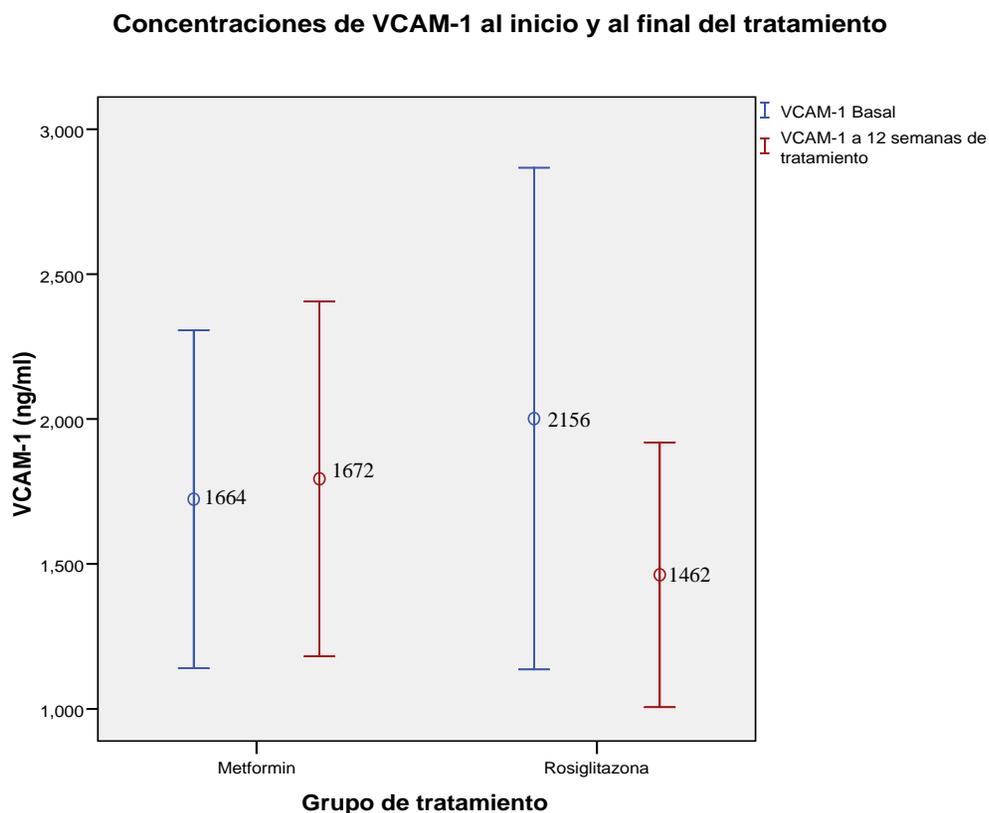
Figura.- 14 Expresión de CD40L plaquetario al inicio y al final del tratamiento en los grupos de terapia combinada



## 2.- CONCENTRACIONES DE VCAM-1 SOLUBLE

Al inicio del estudio la concentración de VCAM-1 soluble en el grupo de Metformin fue  $1664 \pm 810$  ng/ml Vs  $2156 \pm 314$  ng/ml en el grupo de Rosiglitazona ( $p= 0.21$ ). Posterior a las 12 semanas de tratamiento, hubo una reducción clínicamente significativa en la concentración de VCAM-1 soluble en el grupo de tratamiento, en el grupo control no encontramos reducción en las concentraciones de VCAM-1, sin embargo al comparar ambos grupos al final no se alcanzó significancia estadística:  $1672 \pm 1020$  ng/ml Vs  $1462 \pm 791$  ng/ml ( $p= 0.55$ ). (Figura.- 15)

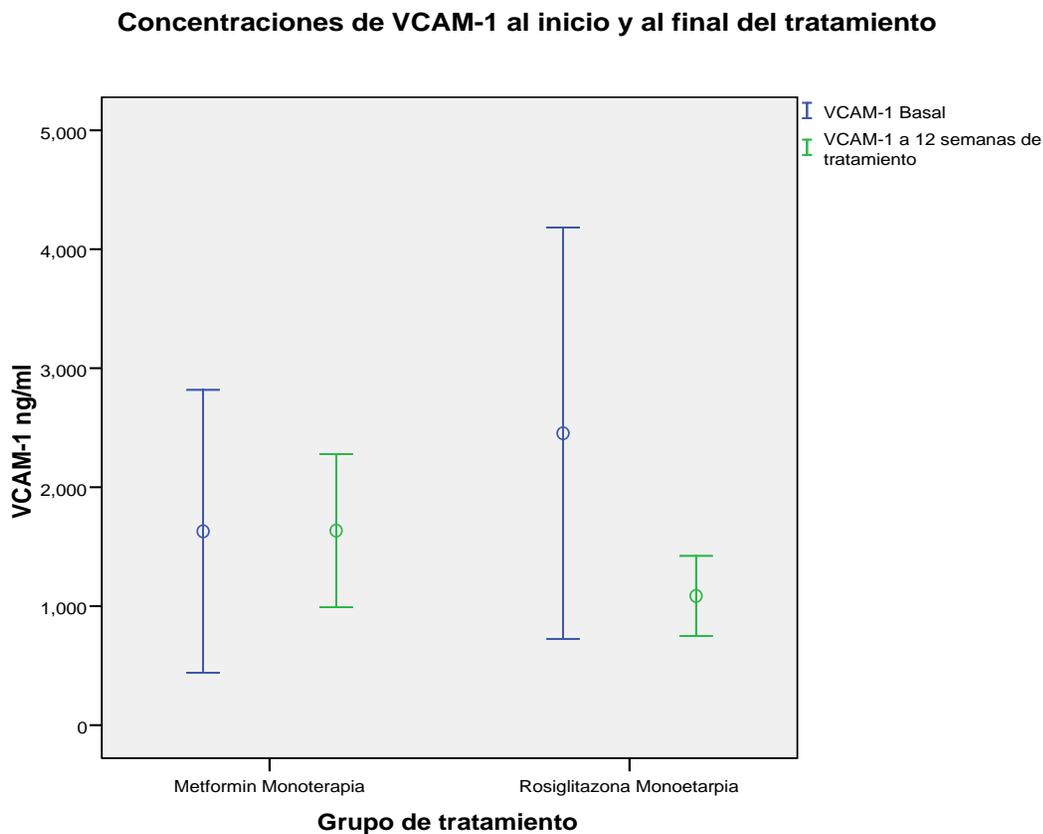
**Figura 15.- Concentraciones de VCAM-1 soluble basal y al final de 12 semanas de tratamiento**



Al realizar el análisis por subgrupos nuevamente observamos que el mayor impacto del tratamiento fue en el grupo de monoterapia.

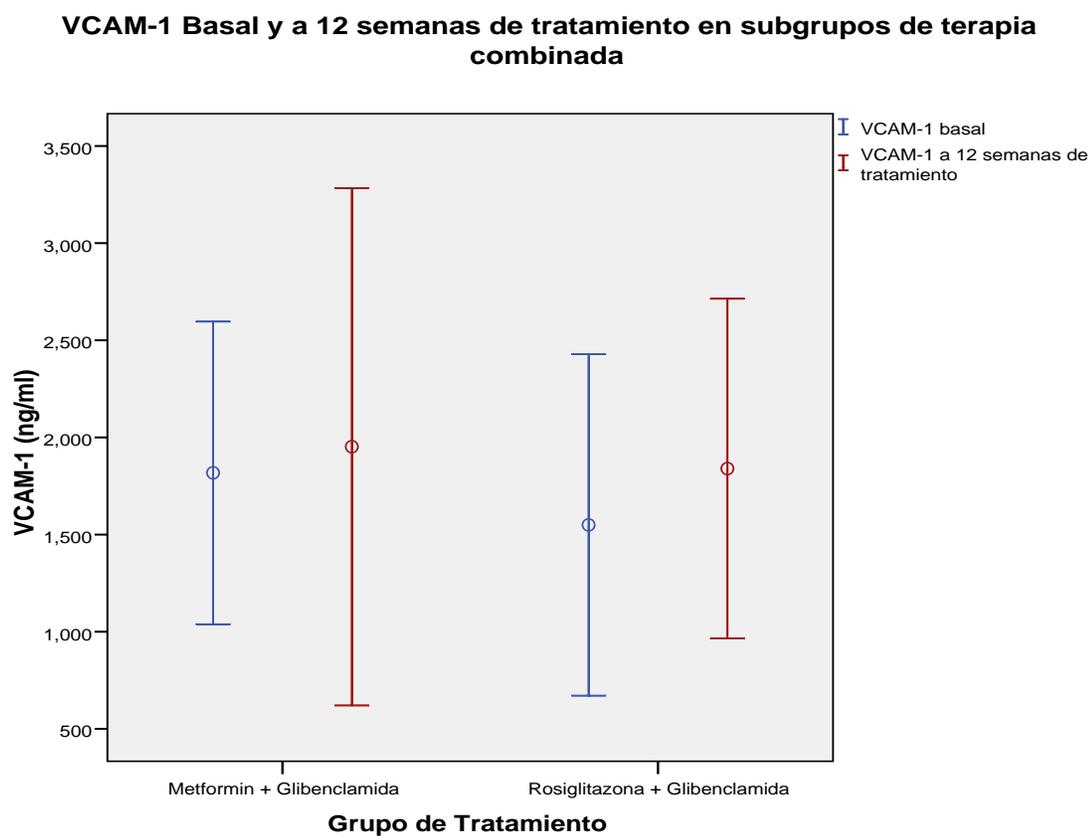
Las cifras basales de VCAM-1 fueron de  $1587 \pm 925$  Vs  $2511 \pm 692$  ng/ml ( $p= 0.11$ ) para el grupo de Metformin y Rosiglitazona respectivamente y posterior a 12 semanas de tratamiento se encontraron en  $1433 \pm$  Vs  $1085 \pm$  ng/ml respectivamente, ( $p= 0.30$ ), (Figura.-16) . En el grupo de Rosiglitazona en monoterapia la reducción en las concentraciones de VCAM-1 soluble fue de 56%.

**Figura.- 16 Concentraciones de VCAM-1 solubles basal y al final de 12 semanas de tratamiento en los subgrupos de monoterapia**



En el grupo de tratamiento combinado las concentraciones de VCAM-1 basales fueron de  $1763 \pm 692$  ng/ml Vs  $1549 \pm 949$  ng/ml ( $p= 0.63$ ) y al finalizar las 12 semanas de tratamiento se encontraron en  $1952 \pm 1268$  Vs  $1839 \pm 945$  ( $p= 0.85$ ).

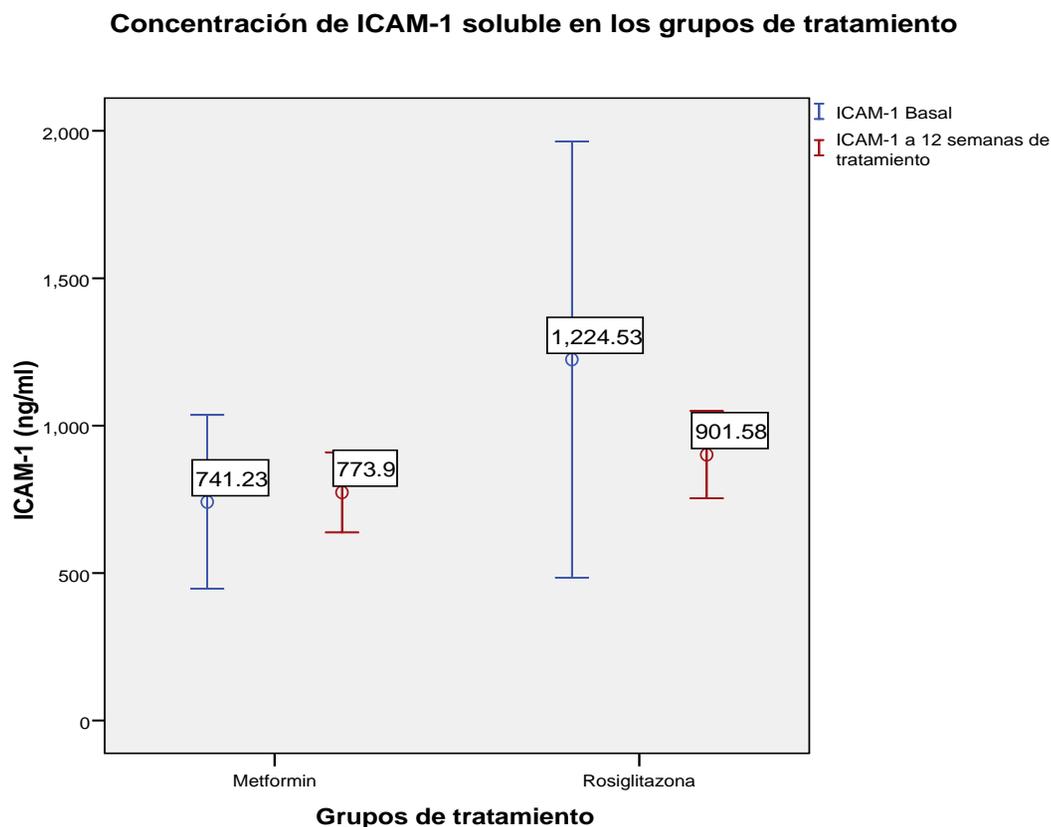
**Figura.- 17 Concentraciones de VCAM-1 solubles basal y al final de 12 semanas de tratamiento en el subgrupo de terapia combinada**



### 3.- CONCENTRACIONES DE ICAM-1 SOLUBLE

Al igual que con el VCAM-1, al inicio del tratamiento las concentraciones fueron homogéneas entre los dos grupos, para Metformin fue de  $741 \pm 488$  ng/ml Vs  $1224 \pm 1096$  ng/ml para Rosiglitazona ( $p=0.10$ ). Al final de las 12 semanas de tratamiento se observó una reducción en las concentraciones de ICAM-1 soluble únicamente en el grupo de terapia experimental:  $773 \pm 225$  ng/ml para Metformin Vs  $901 \pm 256$  ng/ml para el grupo de Rosiglitazona, ( $p= 0.18$ ). Reducción de 26% en el grupo experimental. (Figura.-18 )

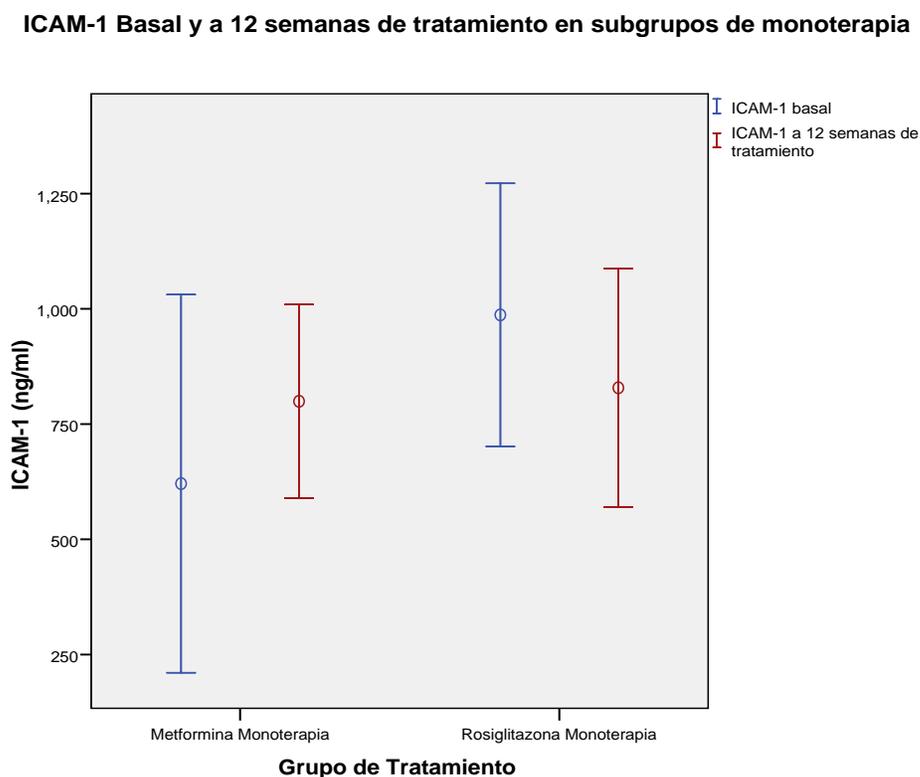
**Figura 18.- Concentraciones de ICAM-1 solubles basal y al final de 12 semanas de tratamiento en los grupos de tratamiento**



Al observar el análisis por subgrupos, en los grupos en que se observó un mayor decremento en las concentraciones de ICAM-1 soluble fue en los dos grupos que recibieron la Rosiglitazona.

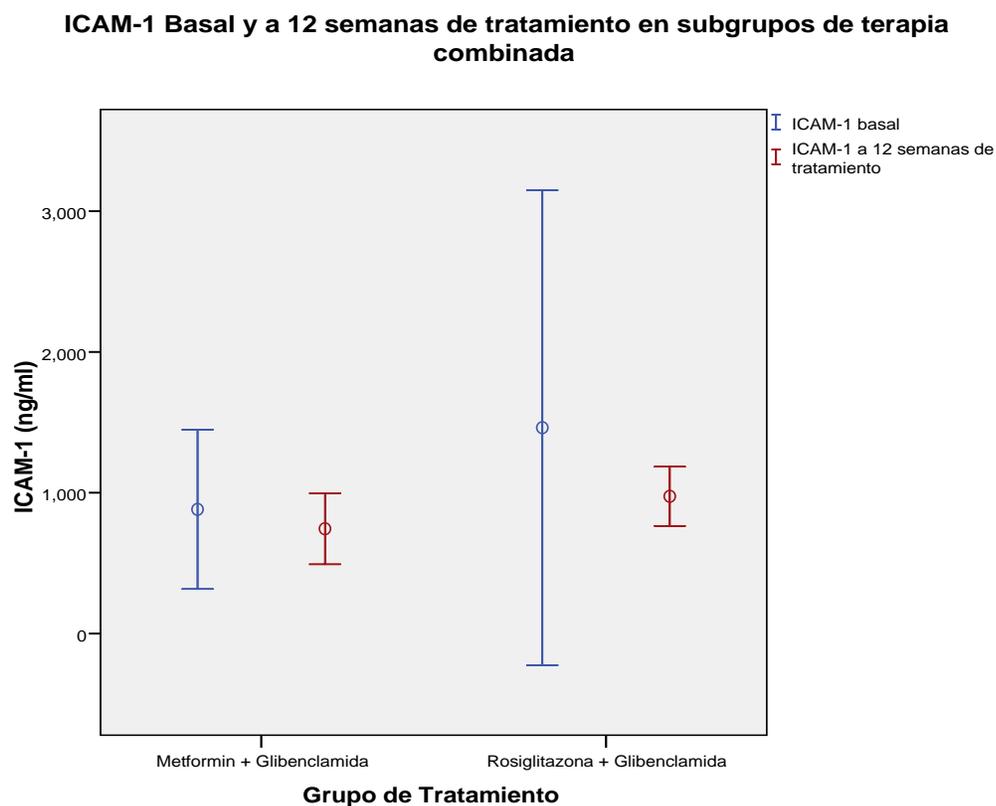
Las cifras basales de ICAM-1 en los grupos de monoterapia fueron de  $634 \pm 437$  ng/ml Vs  $1120 \pm 527$  ng/ml ( $p= 0.007$ ) para Metformin y Rosiglitazona respectivamente. A las 12 semanas de tratamiento se obtuvieron los siguientes valores:  $799 \pm 227$  ng/ml Vs  $828 \pm 280$  ng/ml ( $p= 0.83$ ). Hubo una reducción del 26% en las concentraciones solubles de ICAM-1 en el grupo de Rosiglitazona. (Figura.-19)

**Figura 19.- Concentraciones de ICAM-1 basal y al final del tratamiento en el subgrupo de monoterapia**



En el subgrupo de terapia combinada las cifras basales de ICAM-1 fue de  $953 \pm 527$  ng/ml Vs  $1462 \pm 1824$  ng/ml ( $p= 0.49$ ) para Metformin y Rosiglitazona respectivamente, y a 12 semanas de tratamiento los valores obtenidos fueron  $744 \pm 240$  ng/ml Vs  $974 \pm 227$  ng/ml ( $p= 0.10$ ). (Figura.- 20). Reducción de 33% en el grupo de Rosiglitazona + Glibenclamida y de 21% en el grupo de Metformina + Glibenclamida.

**Figura 20.- Concentraciones de ICAM-1 basal y al final de 12 semanas de tratamiento en el grupo de terapia combinada**



## 8. DISCUSION

En este ensayo clínico controlado aleatorizado, logramos demostrar que el agonista del receptor PPAR $\gamma$  Rosiglitazona tiene un efecto de regulación a la baja en la activación plaquetaria vía CD40L y en la cascada de acontecimientos derivados de la interacción de esta molécula sobre las células endoteliales, ya que el efecto no solo lo observamos sobre el CD40L plaquetario sino también en las fracciones solubles de las moléculas de adhesión vascular VCAM-1 e ICAM-1 en pacientes con diabetes Mellitus tipo 2.

Nuestros resultados son consistentes con estudios experimentales realizados previamente. Un ejemplo de ello son los hallazgos documentados por Marx y cols (2003). Quienes estudiaron pacientes con enfermedad arterial coronaria diagnosticada angiográficamente y que adicionalmente padecían Diabetes Mellitus. En ese ensayo compararon la Rosiglitazona Vs placebo y encontraron una reducción estadísticamente significativa en las concentraciones solubles del CD40L sérico. Sin embargo, en este estudio no se controló el tratamiento hipoglucemiante que tenían los pacientes y por lo tanto eran heterogéneos en cuanto al tratamiento antidiabético, a tal grado que encontraron diferencias estadísticamente significativas en este aspecto.

No obstante, nuestro ensayo difiere en aspectos de gran importancia a los realizados con anterioridad: en primer lugar, a pesar de que la plaqueta es la principal fuente de CD40L soluble presente en la sangre, hasta ahora nunca se había estudiado el efecto de este tipo de fármacos sobre la plaqueta misma. Observamos mediante el FACS el descenso en la expresión del CD40L sobre la

membrana plaquetaria en los pacientes que recibieron Rosiglitazona (ver figura 12). Por otra parte, nos ocupamos de controlar el posible efecto que tienen otros fármacos hipoglucemiantes, y pareamos a los pacientes según el tratamiento recibido. De esta manera pudimos evaluar con mayor confiabilidad el efecto del tratamiento en los diferentes subgrupos.

Entonces, al evaluar los resultados encontramos que de manera basal la expresión del CD40L plaquetario fue muy similar en ambos grupos y posterior a 12 semanas de tratamiento encontramos una reducción estadísticamente significativa en el grupo de monoterapia, pero no en el grupo de terapia combinada, en un análisis (ver figura 11) de intención a tratar. Al analizar el comportamiento del CD40L en el curso de las 12 semanas de duración del experimento, encontramos que el grupo problema mostró una tendencia paulatina al descenso desde el inicio hasta el final del tratamiento. Contrariamente, y por razones no conocidas, el grupo control mostró un incremento progresivo en la expresión del CD40L con el transcurso de las semanas. Posteriormente, la diferencia que observamos en la expresión del CD40L plaquetario entre los dos grupos al final del tratamiento se debió tanto al descenso de éste en el grupo problema como al incremento en el grupo control. Curiosamente al analizar los resultados que obtuvieron Marx y cols (2003) de igual forma se observa un incremento progresivo en las concentraciones séricas de sCD40L en el grupo placebo conforme transcurre el ensayo. No hay suficientes elementos para explicar de manera sólida la razón de ese comportamiento en el grupo control, ya que primeramente en la literatura científica no existe ningún estudio que haya evaluado los efectos del Metformin sobre el

CD40L y en segundo lugar a que las características del tratamiento en el grupo control no fueron modificadas al ingresar al estudio. No obstante, una posible explicación es que el Metformin tiene un efecto contrario a la Rosiglitazona, es decir, incrementa la expresión del CD40L plaquetario. Además, al ingresar los pacientes al estudio y encontrarse en las circunstancias más controladas propias de un ensayo clínico, la adherencia al tratamiento pudo haberse mejorado (efecto Hawthorne) y con esto aumentar la expresión del CD40L plaquetario con respecto a la basal. Sin embargo, es necesario evaluar específicamente a la metformina sobre la expresión del CD40L plaquetario para poder obtener conclusiones confiables en este aspecto.

Al comparar los resultados en los grupos que recibieron terapia combinada (Fig. 14), no observamos diferencia significativa al inicio del estudio ni al final del tratamiento. De hecho, en ambo grupos hubo un incremento en la expresión del CD40L con respecto a la basal.

Evaluando los cuatro subgrupos de manera simultánea, podemos percatarnos de que únicamente en los pacientes que recibieron la Rosiglitazona en monoterapia fue posible demostrar el efecto en la reducción en la expresión del CD40L plaquetario (Fig. 11).

Conociendo la fisiología de la interacción del ligando CD40L plaquetario con el receptor CD40 endotelial, lo cual implica una activación de la célula endotelial y secundariamente la expresión en la membrana celular de las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1, nosotros nos propusimos evaluar adicionalmente el efecto de la Rosiglitazona sobre las concentraciones de sICAM-

1 y sVCAM-1 en los diferentes grupos.

Los resultados obtenidos sobre estas dos moléculas son congruentes con el efecto producido sobre la molécula de CD40L plaquetario. Al evaluar los grupos de tratamiento, fue evidente que el efecto esperado de la reducción en las concentraciones de sVCAM-1 se presentó únicamente en el grupo que presentó reducción del CD40L plaquetario, es decir en el grupo de Rosiglitazona en monoterapia. En este grupo la reducción del sVCAM-1 fue de 56% (2511 ng/1085 ng/ml). En los otros tres grupos, las concentraciones de sVCAM-1 se mantuvieron ya sea sin cambios o bien se incrementaron al final del tratamiento.

Los mismo ocurrió al evaluar el sICAM-1 , donde el mayor efecto se presentó precisamente en el grupo de Rosiglitazona en monoterapia con un descenso del 26% en las concentraciones solubles, en cambio en el grupo control, lejos de disminuir las concentraciones de sICAM-1 lo que observamos fue un incremento en las cifras de esta molécula.

Las implicaciones de estos hallazgos son muchas y de gran interés.

En primer lugar, en lo que respecta al CD40L, no es sencillo conocer con certeza como se puede traducir clínicamente una reducción en la expresión plaquetaria de CD40L ya que no existe precedente de alguna investigación que haya evaluado con anterioridad la influencia del CD40L expresado en la membrana plaquetaria sobre los resultados clínicos o en el contexto de un ensayo clínico. No obstante contamos con algunos datos donde se documenta claramente que a mayores cantidades de sCD40L se incrementa de manera significativa la mortalidad cardiovascular. (Heeschen, 2003).

Como primer ejemplo tenemos el estudio de cohorte de Heeschen y cols (2003) . cuyo objetivo fue determinar si las concentraciones solubles de CD40L incrementaban la probabilidad de muerte cardiovascular en pacientes que previamente habían sufrido un infarto. En su estudio, evaluaron a los pacientes con infarto al miocardio y dependiendo de las concentraciones solubles de CD40L fueron divididos en dos grupos: el grupo de concentraciones elevadas y el grupo de concentraciones bajas, dependiendo si la fracción soluble de CD40L sérico superaba o no los 5 ng/mL. . En sus resultados la incidencia de muerte o infarto no fatal fue mayor en aquellos pacientes con niveles elevados de sCD40L antes de la angioplastia coronaria (4.1 % Vs 0.9 % entre los pacientes con niveles bajos  $P=0.02$ ), igualmente después de 72 hrs, posterior a que se realizó la angioplastia coronaria a todos los pacientes (13.1 % Vs 4.3 %  $P=0.001$ ), después de 30 días (14.5 % Vs 5.3 %,  $P<0.001$ ), y después de 6 meses (18.6 % Vs 7.1 %  $P<0.001$ ).

De igual manera, en un estudio de casos y controles anidado en la cohorte Women's Health Study (WHS), donde participaron mujeres sanas, se determinaron las concentraciones solubles de sCD40L en aquellas mujeres que sufrieron un infarto, un EVC o una muerte cardiovascular aguda y se compararon con un grupo control tomado de la cohorte inicial. Al evaluar las concentraciones basales de sCD40L en ambos grupos, los niveles plasmáticos de sCD40L fueron significativamente superiores en los casos en comparación con los controles ( $2.8\pm 0.35$  Vs  $2.09\pm 0.19$ ) ng/mL  $P=0.02$ ). Esta diferencia se debió casi completamente a un exceso en las concentraciones en los sujetos definidos como casos. Posteriormente las concentraciones de sCD40L fueron divididas en

percentilas, y cuando se evaluaron a las mujeres que superaron la percentila 99<sup>th</sup>, es decir aquellas con una concentración superior a 5.54 ng/mL el riesgo relativo para sufrir infarto, EVC o muerte cardiovascular aguda fue de 11.83, con intervalos de confianza estadísticamente significativos 1.50–93 (P= 0.01).

Estos resultados, aunados al hecho de que el sistema de CD40L-sCD40L en pacientes diabéticos se encuentra sobrerregulado, ponen de manifiesto la gran influencia de este sistema de señal en pacientes de alto riesgo como los son los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

Considerando estos antecedentes, y con el objetivo de poder atenuar este sistema pro-inflamatorio que contribuye al desarrollo y a la progresión de la placa aterosclerótica, nosotros logramos reducir en una cantidad considerable (20%) la expresión del CD40L plaquetario en 12 semanas de tratamiento con Rosiglitazona (Fig. 12).

Por lo tanto, si las elevadas concentraciones solubles de CD40L se traducen en una mortalidad igualmente alta, es de esperarse que la reducción en la expresión del CD40L en la membrana plaquetaria, como lo demostramos nosotros con el inhibidor del PPAR $\gamma$ , influyan en la reducción de mortalidad cardiovascular. Esto tendrá que evaluarse tomando como variable de salida eventos clínicos y no solo variables subrogadas como lo son estos marcadores clínicos de riesgo cardiovascular.

Nuestra intervención no solo tuvo implicaciones en la cantidad de CD40L expresado en la membrana plaquetaria, sino que además observamos una clara reducción de las moléculas de adhesión vascular sICAM-1 y sVCAM-1 (Fig.16, 19).

Esta reducción en las moléculas de adhesión no alcanzaron significancia estadística, lo cual se puede explicar porque que estudiamos una muestra pequeña de pacientes, y ésta representa una reducción clínicamente muy significativa.

La magnitud de esta significancia clínica la podemos ver reflejada en estudios previos que han evaluado las cifras de sVCAM-1 como factor de riesgo para sufrir eventos cardiovasculares.

En primer lugar señalamos el estudio de Agnes Jager y cols (**año**). Quienes investigaron la asociación de la concentración plasmática de sVCAM-1 y el riesgo de mortalidad cardiovascular en una muestra estratificada por edad, sexo y tolerancia a la glucosa (n=631) de la población de una cohorte con edad de 50 a 75 años los cuales fueron seguidos prospectivamente. Los niveles de sVCAM-1 fueron determinados en muestras de estos pacientes previamente congeladas a -70°C. Después de 7.4 años de seguimiento (promedio), 107 (17%) sujetos murieron (42 de causas cardiovasculares). En el grupo completo, los niveles elevados de sVCAM-1 estuvieron significativamente asociados con un incremento en el riesgo de mortalidad cardiovascular (Riesgo Relativo 1.10 [IC 95% 1.05-1.15] después de ajustar edad, sexo y estado de tolerancia a la glucosa. En los sujetos que padecían Diabetes Mellitus tipo 2 el RR fue de 1.13 (IC 95% 1.07-1.20).

Por otro lado, en un estudio de casos y controles anidado en una cohorte, Stefan Blankenberg y cols (2000). Obtuvieron las muestras basales de un estudio de cohorte prospectivo de 1246 pacientes con enfermedad arterial coronaria (estudio AtheroGen). Se determinaron varios marcadores de inflamación, sVCAM-1,

sICAM-1 y sE-selectina. Posteriormente se obtuvo la información del seguimiento sobre los eventos cardiovasculares (media 2.7; máximo 4.1 años). Se encontró de manera independiente que los pacientes que habían presentado eventos cardiovasculares presentaron de manera basal mayores niveles de sVCAM-1 (1932 Vs 1128 ng/mL)  $P = 0.003$  y de sICAM-1 (353 Vs 287 ng/mL  $P=0.015$ ), en relación con aquellos que no los presentaron.

Esta asociación fue independiente de la respuesta inflamatoria general como se ve reflejada con niveles bajos o elevados de proteína C reactiva de alta sensibilidad. En un modelo que controló simultáneamente todos los marcadores inflamatorios y de adhesión solubles, solo el sVCAM-1 permaneció independientemente significativo para futuros eventos cardiovasculares con un incremento en el riesgo de 2.8 veces en el riesgo ( $p= 0.003$ ).

Los niveles séricos de las moléculas de adhesión sVCAM-1, sICAM-1, y sE-selectina se encontraron significativamente relacionadas con futura muerte cardiovascular entre los pacientes con enfermedad arterial coronaria documentada. La sVCAM-1 especialmente añadió valor predictivo de los clásicos factores de riesgo hs-CRP y en determinar el riesgo de futura muerte cardiovascular. En esta investigación se pudo observar que entre mayores sean las concentraciones de sVCAM-1 en el paciente, mayor es el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares. Así, tenemos que los pacientes que se encontraban por encima de la percentila 50<sup>th</sup> en donde el punto de corte fue de 1140 ng/mL el riesgo de muerte cardiovascular fue de 2.2 (IC 95% 1.1-4.0) y en aquellos

pacientes donde superaron la percentila 75 th con un punto de corte de 1588 ng/mL el riesgo de muerte cardiovascular fue de 2.6 (1.5 - 4.4).

En nuestro estudio, de manera basal los pacientes presentaron concentraciones elevadas de sVCAM-1. En el grupo de Metformina Monoterapia las cifras basales de sVCAM-1 fueron de 1587 ng/mL y en la Rosiglitazona Monoterapia de 2511 ng/mL ( $p= 0.11$ ) y tras 12 semanas de tratamiento logramos reducir las concentraciones de sVCAM-1 en el grupo de Rosiglitazona Monoetrapia en un 56% (1085 nd/mL). Tomando en cuenta los datos de la investigación de Stefan Blankenberg, esto se traduce en que de manera inicial nuestros pacientes superaban el riesgo de 2.6 veces la probabilidad de sufrir una muerte cardiovascular ya que las concentraciones de sVCAM-1 estaban muy por encima del punto de corte de 1588 ng/mL de la percentila 75 th, y posterior al tratamiento se ubicaron en un riesgo inferior al 2.1 de la percentila 50 th, donde el punto de corte era de 1140ng/mL.

Estos resultados aplican igualmente para sICAM-1. En el estudio de Blankenberg los pacientes que mostraban un incremento en las cifras solubles de sICAM-1 tuvieron mayor probabilidad de evento cardiovascular fatal en comparación con aquellos que estaban por debajo de la percentila 50 th, sin embargo aquí no se observó un incremento directamente proporcional como el observado en el sVCAM-1. En esta investigación, aquellos que estuvieron por encima de la percentila 50 th (punto de corte de 289 ng/mL) el riesgo de muerte cardiovascular fue de 2.1 (IC 95% 1.3-3.5) en cambio aquellos que mostraron cifras superiores

a la percentila 75 th con un punto de corte de 389 ng/mL el riesgo de muerte cardiovascular 1.8 (IC 95% 1.1-2.9).

Nuestros pacientes, tuvieron cifras mayores que las encontradas en ese estudio: para Metformin fue de 765  $\pm$ 488 ng/ml Vs 1246  $\pm$ 1096 ng/ml para Rosiglitazona (p=0.10). No obstante, se logró una reducción de 26% en las concentraciones de sICAM-1 en el grupo de Rosiglitazona Monoterapia.

Estos resultados demuestran claramente que el agonista del receptor PPAR $\gamma$  Rosiglitazona es capaz de reducir la expresión del CD40L plaquetario y con esto regular a la baja la vía de señal CD40L plaquetario-CD40L endotelial y de esta manera, reducir las concentraciones de sVCAM-1 y sICAM-1 en pacientes con diabetes Mellitus tipo 2. En concordancia con los estudios descritos previamente, debe, al menos en teoría, reducir la probabilidad de que estos pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 sufran muerte por causa cardiovascular.

Ahora, hay una serie de cuestiones que debemos abordar independientemente de los resultados favorables que obtuvimos.

Uno de los puntos de crucial importancia son los datos publicados del meta-análisis del Dr. Nissen y Wolski en junio del 2007, que son contradictorios al efecto propuesto por nosotros. En ese metanálisis se evaluaron un total de 42 ensayos clínicos que comparaban el efecto de la Rosiglitazona contra cualquier otro antidiabético. En el grupo de la Rosiglitazona, comparado con el grupo control, la OR para infarto al miocardio fue de 1.43 (IC 95% 1.03 a 1.98; P= 0.03), y la OR para muerte de causas cardiovasculares fue de 1.64 (IC 95%, 0.98 a 2.74; P=

0.06). Estas cifras refutan los efectos benéficos de la Rosiglitazona sobre el perfil de riesgo cardiovascular documentados por nuestro trabajo.

Hemos señalado ya en los antecedentes las razones por las que este meta-análisis ha sido criticado con anterioridad, y ahora señalaremos otra de las razones por las cuales los resultados pueden no ser del todo irrefutables:

En nuestro estudio, los resultados sobre el CD40L plaquetario variaron considerablemente cuando la Rosiglitazona la prescribimos en monoterapia en comparación a cuando la prescribimos en combinación con la Glibenclamida, a tal grado que de manera basal no hubo diferencia significativa entre la Rosiglitazona en monoterapia y la Rosiglitazona + Glibenclamida 5135 UFT Vs 5245 UFT,  $p=0.96$ , pero al evaluar los resultados al final de las 12 semanas de tratamiento observamos que los pacientes en quienes prescribimos la Rosiglitazona junto con la Glibenclamida hubo un considerable incremento en la expresión del CD40L plaquetario, lo cual no se mostró en el grupo de la Rosiglitazona en Monoterapia: 4082 UFT Vs 9094  $p=0.32$ .

Ahora, observando los ensayos que incluyeron en su meta-análisis Nissen y Wolski, podemos notar que de los 42 ensayos incluidos en el análisis solamente en 14 de ellos se prescribió la Rosiglitazona en monoterapia y en el resto se proporcionó junto con algún otro hipoglucemiante, dentro de los cuales podemos incluir los siguientes: metformina, glibenclamida, insulina, glipizida, glimepirida, clorpropamida, tolbutamida o gliquidona. Esto quiere decir, que el efecto adverso observado puede deberse al efecto de la prescripción del anti-diabético alterno o a la combinación de los dos hipoglucemiantes y no solo al efecto propio de la

Rosiglitazona.

Igualmente en el ensayo clínico publicado por Philip D. Home y cols (2007), el grupo de Rosiglitazona no se prescribió como monoterapia, sino que se evaluó ya sea en conjunto con Metformin o con una Sulfonilurea.

Para poder confirmar esta hipótesis, es necesario realizar un análisis únicamente con los ensayos que evalúan a la Rosiglitazona en monoterapia excluyendo aquellos en donde se proporciona junto con otros medicamentos.

Así pues, es de vital importancia que tanto al aprobar el uso como al prescribir un hipoglucemiante, se evalúen otros puntos adicionales a su capacidad para reducir las concentraciones de glucosa plasmática y la hemoglobina glucosilada, ya que más allá de este efecto superficial, hay mecanismo moleculares que en gran medida influyen en los desenlaces clínicos, los cuales pueden ser la causa de que hasta la fecha no hemos sido capaces de reducir la mortalidad cardiovascular en este grupo de pacientes de elevado riesgo.

Estos cuestionamientos no son nuevos. El meta-análisis de Nissen y Wolski, solamente puso el dedo en la llaga en un tema que finalmente requiere de un análisis minucioso: ¿Qué datos debemos obtener para aprobar el uso de fármaco anti-diabético?

Hasta ahora, la FDA requiere que un nuevo medicamento encaminado a tratar la Diabetes Mellitus reduzca las concentraciones plasmáticas de glucosa y hemoglobina glucosilada y que además no exista una evidencia de que incremente el riesgo de eventos adversos, sin embargo, no requiere que disminuya el perfil de riesgo cardiovascular. Con estas bases, desde 1995, ocho

nuevas clases de medicamentos han sido aprobados para tratar la diabetes: metformin, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, análogos de amilina, análogos del péptido similar al glucagon, inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, y secuestradores de ácidos biliares.

A pesar de este gran abanico de posibilidades en el tratamiento de la diabetes mellitus, ninguno de los fármacos aquí señalados, ha mostrado de manera consistente reducir la mortalidad cardiovascular.

Lejos aún de mostrar una reducción en la mortalidad en los pacientes diabéticos, en un ensayo clínico realizado a gran escala donde se evaluó el efecto de una terapia intensiva con la finalidad de reducir la HbA1c a cifras cercanas a la normal, por razones inexplicables, el efecto obtenido fue de un incremento en la mortalidad en aquellos sujetos que alcanzaron el objetivo propuesto. (Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, et al 2007)

Esta claro entonces, la trascendencia que tiene el conocimiento profundo de los efectos de los hipoglucemiantes sobre los mecanismos celulares implicados en el inicio, mantenimiento y progresión de la placa aterosclerótica, que finalmente se verán reflejados en las devastadoras consecuencias clínicas que disminuyen de forma drástica la supervivencia del paciente diabético: debido a infartos al miocardio, a enfermedad vascular cerebral y a enfermedad arterial periférica.

La comunidad científica mundial se

encuentra ahora mismo analizando estas cuestiones y podemos estar seguros de que en los próximos años experimentaremos un cambio en la manera de tratar al paciente diabético, un cambio donde los objetivos de tratamiento no serán la

reducción de la glucosa plasmática, sino más bien, y de capital importancia, la reducción de la mortalidad por complicaciones macrovasculares.

## 9. CONCLUSIONES

1.- La Rosiglitazona reduce de manera significativa la expresión del ligando CD40L plaquetario en comparación con el Metformin en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

2.- La Rosiglitazona reduce de manera clínicamente significativa las concentraciones de sVCAM-1 en comparación con el Metformin en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

3.- La Rosiglitazona reduce de manera clínicamente significativa las concentraciones de sICAM-1 en comparación con el Metformin en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2

4.- La Rosiglitazona junto con la Glibenclamida no mostró un efecto favorable en la reducción del marcador subsidiario de riesgo cardiovascular CD40L

5.- Es necesario investigar el efecto de los hipoglucemiantes orales tanto de manera aislada para cada uno de ellos como de manera combinada con otros anti-diabéticos sobre los mecanismos celulares que subyacen el desarrollo de complicaciones cardiovasculares.

## 10. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar un meta-análisis con el objetivo de estimar el efecto de la Rosiglitazona sobre el riesgo de sufrir un infarto o muerte de causas cardiovasculares incluyendo únicamente aquellos ensayos donde la Rosiglitazona se prescribe como Monoterapia y no junto con otros anti-diabéticos.

Igualmente se requieren estudios que evalúen el efecto de los hipoglucemiantes orales de uso más común sobre el Ligando CD40 plaquetario y en la cascada de acontecimientos derivada de la interacción de esta molécula con las su complemento en las células endoteliales.

De vital importancia, son las investigaciones encaminadas a determinar las posibles consecuencias que los diferentes hipoglucemiantes orales pueden tener sobre las complicaciones cardiovasculares en una población ya de por sí vulnerable a padecerlas como lo son los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- 1.- McCarthy D, Simmet P. **Diabetes 1994 to 2010: global estimates and projections.** Melbourne: *International Diabetes Institute*;
- 2.- Encuesta nacional de salud 2000 [www.insp.mx/ensa2000](http://www.insp.mx/ensa2000)
- 3.- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 [www.insp.mx/ensanut/ensanut2006](http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006)
4. - Goldman, Lee. Cecil MEDICINE. 2007 33ª. Saunders Elsevier. Philadelphia
- 5.- N Engl J Med 2003;349:60-72
- 6.- Göran K. Hansson, M.D., Ph.D. **Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease.** N Engl J Med 2006;352(16):1685-95
- 7.- Burton E. Sobel, MD. **Optimizing Cardiovascular Outcomes in Diabetes Mellitus.** *AJM* 2007;120(9B):S3-S11
- 8.- Braunwald E: **Cardiovascular medicine at the turn of the millennium: Triumphs, concerns, and opportunities.** New Engl J Med. 1997; 337:1360-1369
- 9.- Mukamal KJ, Nesto RW, Cohen MC, et al: **Impact of diabetes on long-term survival after acute myocardial infarction: Comparability of risk with prior myocardial infarction.** Diabetes Care 2001; 24:1422.
- 10.- Fang J, Alderman MH: **Impact of the increasing burden of diabetes on acute myocardial infarction in New York City.** Diabetes 2006; 55:768
- 11.- Moreno PR, Murcia AM, Palacios AF, et al: **Coronary composition and macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus.** Circulation 2000; 102:2180
- 12.- Colwell JA, Nesto RW: **The platelet in diabetes:** Focus on prevention of ischemic events. Diabetes Care 2003; 26:2181
- 13.- Nichols GA, Hillier TA, Erbey JR, et al: **Congestive heart failure in type 2 diabetes: Prevalence, incidence, and risk factors.** Diabetes Care 2001; 24:1614
- 14.- Braunwald, E. et al. **BRAUNWALD'S Heart Disease** 8a ed. 2007. El Sevier. Philadelphia
- 15.- Adkinson, F. et al. **Middleton's Allergy: Principles and Practice,** 6a ed. 2003. Mosby, Inc. Philadelphia
- 16.- Stefan, B et al. **Circulating Cell Adhesion Molecules and Death in Patients With Coronary Artery Disease.** *Circulation.* 2001;104:1336-1342

- 17.- Iqbal Malik et al. **Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis.** *Lancet* 2001; 358: 971–75
- 18.- Hoffman, R. et al. **Hematology: basic Principles and Practice.** 4<sup>a</sup> Ed.2005. El Sevier. Philadelphia
- 19.- Jane E. Freedman **CD40-CD40L and platelet Function.** *Circ Res.* 2003;92:944-946
- 20.- Jamie J. O'Brien, Denise M. Ray, Sherry L. Spinelli, et al. **The platelet as a therapeutic target for treating vascular diseases and the role of eicosanoid and synthetic PPAR $\gamma$  ligands** *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 2007; 82: 68–76
- 21.- Uwe Schönbeck, PhD, **CD40 Signaling and Plaque Inestability.** *Circ. Res.* 2001;89:1092-1103
- 22.- Armitage, RJ. Et al. **Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40.** *Nature.* 1992;357:80-82
- 23.- Cocks BG, et al. **IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells active by CD40 ligand.** *Int Immunol.* 1993;5:657-663
- 24.- Mach F, et al. **Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1931-1936
- 25.- Volker Henn, Joseph R. Slupsky, Michael Gräfe **CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells** *Nature* 1998; 391: 591-594
- 26.- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW et al. **Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes.** *N Engl J Med* 2003;348:1104-1111
- 27.- Uwe Schönbeck, PhD, Nerea Varo, PhD, Peter Libby, MD, et al. **Soluble CD40L and cardiovascular Risk in Women** *Circulation.* 2001;104:2266-2268
- 28.- Hannele Yki-Järvinen, M.D., F.R.C.P. **Thiazolidinediones.** *N Engl J Med* 2004;351:1106-18
- 29.- Kristina Schoonjans, Johan Auwerx **Thiazolidinediones: an update** *Lancet* 2000; 355: 1008–10
- 30.- Berger, J.; Moller, D. **The Mechanism of Action of PPARs.** *Annu. Rev. Med.* 2002;53:409-35
- 31.- Beckman, J. et al. **Peroxisome proliferator active receptor gamma and its activation in the treatment of insulin resistance and atherosclerosis: issues and opportunities.** *Curr Opin Cardiol* 2003, 18:479-485
- 32.- Steven E. Nissen, M.D., Kathy Wolski. **Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infraction and Death fron Cardiovascular Causes.** *N Engl J Med* 2007;356:2457-71
- 33.- Diamond, G. et al. **Uncertain Effects of Rosiglitazone on the Risk for Myocardial Infraction**

**and Cardiovascular Detah.** *Ann Int Med* 2007;147(8):checar página

34.- Friedrich, J. **Inclusion of zero total events trials in meta-analyses maintains analytic consistency and incorporates all available data.** *Medical Research Methodology* 2007;7:5

35.- Philip D. Home, et al. **Rosiglitazone Evaluated for Cardiovascular Outcomes-An Interim Analysis.** *N Engl J Med* 2007;357: 28-38

36.- Clifford J. Rosen. **The Rosiglitazone Story-Lessons from an FDA Advisory Committee Meeting.** *N Engl J Med* 2007;357:1-3

37.- Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, et al. **Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPAR $\gamma$ , and PPAR $\gamma$  agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes.** *Blood* 2004;104:1361.

38.- Nikolaus Marx, MD et al. **Effect of Rosiglitazone Treatment on Soluble CD40L in Patients With Type 2 Diabetes and Coronary Artery Disease.** *Circulation* 2003;107:1954-1957

## 12. ANEXO 1

**HOJA DE RECOLECCION DE DATOS**  
**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**HOSPITAL DE ESPECIALIDADES**  
**CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA**  
**SERVICIO DE MEDICINA INTERNA**  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE EFECTO DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE EL LIGANDO**  
**CD40 PLAQUETARIO, CD40 SOLUBLE, ICAM-1 Y VCAM-1 SOLUBLES EN PACIENTES CON**  
**DM-2**

Nombre \_\_\_\_\_ No. Afiliación \_\_\_\_\_  
 Edad \_\_\_\_\_ Género \_\_\_\_\_ Ocupación \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES HEREOFAMILIARES**

Infectológicos Si ( ) No ( ) Especificar \_\_\_\_\_  
 Neoplásicos Si ( ) No ( ) Especificar \_\_\_\_\_  
 Reumatológicos Si ( ) No ( ) Especificar \_\_\_\_\_  
 Cardiopatías Si ( ) No ( ) Especificar \_\_\_\_\_  
 Endocrinológicos Si ( ) No ( ) Especificar \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS**

Tabaquismo Si ( ) No ( ) Cantidad por semana \_\_\_\_\_ Años fumando \_\_\_\_\_  
 Alcoholismo Si ( ) No ( ) Cantidad al mes \_\_\_\_\_ Embriaguez si ( ) No ( )  
 Toxicomanías Si ( ) No ( ) ¿Cuáles? \_\_\_\_\_ Frecuencia \_\_\_\_\_  
 Usuario de fármacos y drogas intravenosas? Si ( ) No ( ) Cual \_\_\_\_\_  
 Prácticas de actividades sexuales de riesgo: No. de parejas sexuales \_\_\_\_\_  
 Homosexualismo \_\_\_\_\_ Protección Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Otras \_\_\_\_\_ Especificar \_\_\_\_\_  
 Tatuajes Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Perforaciones Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Combe Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS**

Transfusiones \_\_\_\_\_  
 Causa de la transfusión \_\_\_\_\_  
 Cirugías previas si ( ) No ( ) Cuáles \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Enfermedad	Si	No	Tiempo de diagnóstico y complicaciones	Tratamiento empleado
Hipertensión Arterial				
Cardiopatías				
Reumatológicos				
Endocrinológicos (tiroides, suprarrenales)				

Neuropatías				
Enfermedad ácido péptica				
Enfermedad de transmisión sexual				
Otras patologías gastrointestinales				

**DIABETES:**

Hace cuantos años se conoce diabético: \_\_\_\_\_

Que tratamientos ha recibido desde su diagnóstico (cronología):

\_\_\_\_\_

¿Realiza algún ejercicio? ¿Cuál? ¿Con que frecuencia?

\_\_\_\_\_

¿Tiene alguna dieta especial para su Diabetes Mellitus? Indique cual

\_\_\_\_\_

**INTERROGATORIO POR APARATOS Y SISTEMAS****a) Gastrointestinal**

Pirosis (aguras) Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

Dolor Abdominal Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

**Tránsito intestinal**

\* Diarrea: Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

\* Náusea Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

\* Vómito Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

\* Constipación Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

\* Disminución del diámetro de las heces Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

Hemorragia Gastrointestinal Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

**b) Respiratorio:**

Tos Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

Hemoptisis Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

## c) Cardiovascular:

Palpitaciones Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_  
 Edema Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_  
 Disnea Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_  
 Dolor torácico Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

## d) Neuropsiquiátrico:

Insomnio Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_  
 Llanto fácil Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_  
 Sentimiento de Minusvalía Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_  
 Antecedente de EVC Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_  
 Parkinson o Transtornos motores Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

## e) Endocrinológico:

Sed	Aumentada ( )	Normal ( )	Disminuida ( )
Hambre	Aumentada ( )	Normal ( )	Disminuida ( )
Piel	Seca y caliente ( )	Normal ( )	Húmeda con edema ( )
Actividad física	Aumentada ( )	Normal ( )	Disminuida ( )
Intolerancia al	Frió ( )	Calor ( )	

f) Presencia de fatiga Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

Astenia y adinamia Si ( ) No ( ) Semiología: \_\_\_\_\_

g) Otros datos relevantes \_\_\_\_\_

h) Pérdida de peso involuntaria \_\_\_\_\_

Pérdida de peso en kg \_\_\_\_\_

Porcentaje de la pérdida de peso \_\_\_\_\_

## EXPLORACIÓN FÍSICA

Ictericia Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_

Palidez Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Hepatalgia Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Hepatomegalia Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Telangiectasias Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Esplenomegalia Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Acné Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Artritis Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_  
 Dermatitis Si ( ) No ( ) \_\_\_\_\_

#### Hallazgos importantes

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

#### LABORATORIO Y GABINETE

Anemia Si ( ) No ( ) Especificar: \_\_\_\_\_  
 Hipoalbuminemia Si ( ) No ( ) Especificar: \_\_\_\_\_  
 Aumento de DHLs Si ( ) No ( ) Especificar: \_\_\_\_\_  
 Hiperbilirrubinemia Si ( ) No ( ) Especificar: \_\_\_\_\_

#### Biometría Hemática Completa

Hb \_\_\_\_\_ g/dL Hto \_\_\_\_\_ % Plaquetas \_\_\_\_\_ millones/ml  
 Leucocitos \_\_\_\_\_ millones/ml Linfocitos \_\_\_\_\_ % Neutrófilos \_\_\_\_\_ %  
 Monocitos \_\_\_\_\_ % Eosinófilos \_\_\_\_\_ % Basófilos \_\_\_\_\_ % VSG \_\_\_\_\_ mm/h

#### Química Sanguínea

Glucosa \_\_\_\_\_ mg/dL Creatinina \_\_\_\_\_ mg/dL Urea \_\_\_\_\_ mg/dL BUN \_\_\_\_\_ mg/dL  
 Acido úrico \_\_\_\_\_ mg/dL

#### Perfil de lípidos

Colesterol \_\_\_\_\_ mg/dL Triglicéridos \_\_\_\_\_ mg/dL LDL \_\_\_\_\_ mg/dL HDL \_\_\_\_\_ mg/dL

#### Pruebas de funcionamiento hepático

Albúmina \_\_\_\_\_ g/dL AST \_\_\_\_\_ UI/ml ALT \_\_\_\_\_ UI/ml DHL \_\_\_\_\_ UI/ml  
 FA \_\_\_\_\_ UI/ml GGT \_\_\_\_\_ UI/ml B Tot \_\_\_\_\_ mg/ml B Dir \_\_\_\_\_ mg/ml Glob \_\_\_\_\_ g

#### Coagulación

TP \_\_\_\_\_ seg TTP \_\_\_\_\_ seg INR \_\_\_\_\_ IP \_\_\_\_\_

#### Examen General de Orina

pH \_\_\_\_\_ Densidad \_\_\_\_\_ Albúmina \_\_\_\_\_ Hb \_\_\_\_\_ Leucocitos \_\_\_\_\_ Eritrocitos \_\_\_\_\_  
 Sedimento \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## Efectos secundarios

	1er mes	2do mes	3er mes
Astenia			
Adinamia			
Anorexia			
Fatiga			
Hemorragia			
Anemia			
Cefalea			
Escalofrío			
Náusea			
Vómito			
Pérdida de peso			
Fiebre			
Artralgias			
Mialgias			
Mareo			
Ansiedad			
Depresión			
Irritabilidad			
Insomnio			
Disnea			
Piel seca			
Ictericia			
Dolor en hipocondrio derecho			

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

## INFORME AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

**TITULO: “EFECTO DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE EL LIGANDO CD40 PLAQUETARIO, CD40 SOLUBLE Y MOLECULAS DE ADHESION ENDOTELIALES ICAM-1 Y VCAM-1 EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS-2”**

PROTOCOLO No:

INVESTIGADORES: Dr. Maximiliano García de la Peña

Dr. Adolfo René Méndez Cruz

TELEFONO: 57 24 59 00 Ext 23449

CENTRO: Hospital General y Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza

Antes de que usted decida tomar parte en este estudio de investigación, es importante que lea, cuidadosamente, este documento. Su médico discutirá con usted el contenido de este informe, y le explicará todos aquellos puntos en los que tenga dudas. Si después de haber leído toda la información usted decide participar en este estudio, deberá firmar este consentimiento en el lugar indicado y devolverlo a su médico. Usted recibirá una copia de este consentimiento informado.

*Objetivos del estudio*

A usted se le ha pedido que participe en un estudio de investigación de un fármaco utilizado en diabetes. Este estudio tiene el objetivo de evaluar el fármaco en la disminución de la aterosclerosis en el paciente diabético, de tal forma que pueda disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares.

*Procedimiento a seguir*

Si usted acepta participar en este estudio se le realizará un examen físico y unos estudios de laboratorio. Se le tomaran muestras de sangre al inicio del estudio, a las 6 y 12 semanas, usted tomará este medicamento en conjunto con su tratamiento estandar. La duración del tratamiento es de 12 semanas, durante los cuales usted acudirá a cita en el consultorio con su médico los siguientes días.

Día 1 (antes del tratamiento), semana 4, semana 8 y semana 12.

**Es importante que usted no pierda estas citas**

En cada visita usted será examinado (a) por su médico y se tomarán muestras de sangre en ayuno en cada visita que realice. En cada visita usted le deberá mostrar el medicamento a su médico, y deberá contarle de los síntomas que presente durante el tratamiento. Es muy importante que usted tome todos sus medicamentos según se le ha indicado. Usted recibirá toda su medicación del estudio. Continuará tomándola en la misma forma por un total de 12 semanas.

En caso de que usted necesitara ser visto por otro médico, es importante que el/ella sepa que usted esta participando en un estudio de investigación. A usted se le entregará una tarjeta que dice que usted es un participante de un estudio de investigación, la tarjeta tiene el número de teléfono donde puede ser localizado su médico, usted deberá llevar esta tarjeta todo el tiempo y devolverla al final del estudio al médico encargado. Su médico del estudio deberá saber si usted consulto con otro médico.

*Experiencia anterior con el medicamento*

Este medicamento ha sido probado en miles de sujetos que tienen diabetes mellitus tipo 2 para el control de la misma, los efectos adversos que puede provocar son: nausea, vómito, debilidad, alteración de la función hepática. Existen datos conflictivos de que puede asociarse a riesgo cardiovascular. Puede ser que aún no se hayan reportado algunos efectos adversos.

*Tratamiento alternativo*

Es importante que sepa que no es necesaria su participación en el estudio para el control de su enfermedad.

*Exclusiones*

Si usted cuenta con algunas de estas condiciones no podrá participar en el estudio:

- En tratamiento con alguna tiazolidinadiona (pioglitazona, troglitazona, rosiglitazona)
- En tratamiento con alguna estatina (pravastatina, atorvastatina, simvastatina, etc)
- Angina inestable o infarto del miocardio durante las 4 semanas previas
- Daño en la función hepática (elevación de enzimas hepáticas de mas de 2 veces su valor normal, incluyendo bilirrubinas)

- Tratamiento actual con insulina
- Insuficiencia renal que requiera hemodiálisis
- Neoplasias
- Enfermedad Inflamatoria Sistémica
- Cirugía mayor reciente en las 2 semanas previas
- Insuficiencia Cardíaca Congestiva Clase Funcional III o IV de la NYHA

#### *Beneficios para los participantes*

Su condición de salud puede mejorar como resultado de su participación en este estudio. Sin embargo no hay ninguna garantía de que usted reciba algún beneficio médico por dicha participación

#### *Remuneración por su participación en el estudio*

Usted recibirá los medicamentos y se le harán los exámenes del estudio, sin costo alguno de su parte. No existe ninguna remuneración económica por su participación en este estudio.

#### *Compensación en caso de lesión*

Si usted sufriera una lesión como consecuencia de los medicamentos o procedimientos de este estudio, el médico: Dr. Maximiliano García de la Peña, investigador principal, le brindará la atención médica que necesite, el costo de este cuidado será cubierto por el hospital de especialidades del CMN La Raza.

#### *Confidencialidad*

A menos que la ley lo exija, solo el investigador y colaboradores tendrán acceso a los datos confidenciales que lo identifican a usted por su nombre, su identificación no aparecerá en ningún informe ni publicación resultante del presente estudio.

#### *Nuevos hallazgos*

Se le informará sobre cualquier nuevo hallazgo importante que se documente durante el estudio que pudiera afectar su voluntad de continuar participando en el.

#### *Contactos*

El investigador o la persona que el designe ha contestado todas sus preguntas. Si usted tiene

preguntas adicionales durante el estudio acerca de la investigación o de sus derechos como sujeto de investigación, puede dirigirse a: Dr. Adolfo René Méndez Cruz en el 5º piso del HG CMN La Raza. En caso de lesión relacionada con la investigación o de cualquier otro problema, sírvase comunicarse con Dr. Maximiliano García de la Peña al teléfono 53 92 53 72

*Participación voluntaria*

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted puede negarse a participar o puede interrumpir su participación en cualquier momento durante el estudio, sin perjuicio alguno ni pérdida de sus derechos. Si decide interrumpir su participación, puede recibir el resto de su tratamiento sin perjuicio alguno de su tratamiento médico o de participación en estudios futuros. Además, el investigador puede dar por terminada su participación, independiente de su consentimiento, si usted requiere medicamentos no permitidos ha violado el protocolo de estudio.

*Consentimiento*

He leído y entendido este consentimiento informado. He recibido respuesta a todas mis preguntas. Acepto voluntariamente participar en este estudio.

Al firmar esta fórmula no estoy renunciando a mis derechos legales que de todas maneras tengo como participante en un estudio de investigación

_____	_____	_____
Nombre del participante	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del testigo	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del investigador	Firma	Fecha