



**Facultad de Medicina
Departamento de Psiquiatría
Doctorado de Patología Existencial e Intervención en Crisis**

**ESTRÉS PSICOSOCIAL, REACTIVIDAD AL ESTRÉS Y
MARCADORES BIOQUÍMICOS LDL-OXIDADA Y ANTI-HSP60:
SU RELACIÓN EN EL ACV ISQUÉMICO**

**AUTOR:
Norys Margarita Rodríguez de Cruz
DIRECTORES:
Dr. José Regino Peña
Dr. José María Poveda**

**Mérida – Venezuela
Septiembre, 2015**



**Facultad de Medicina
Departamento de Psiquiatría**

JOSÉ REGINO PEÑA, Profesor de la
Facultad de Medicina de la Universidad de Carabobo.

CERTIFICO

Que **Norys Margarita Rodríguez de Cruz**, ha realizado bajo mi dirección,
el trabajo “**ESTRÉS PSICOSOCIAL, REACTIVIDAD AL ESTRÉS Y
MARCADORES BIOQUÍMICOS LDL-OXIDADA Y ANTI-HSP60:
SU RELACIÓN EN EL ACV ISQUÉMICO**”

Dicho trabajo reúne a mi juicio las condiciones de originalidad y rigor necesario, por
lo que avalo su presentación para ser juzgada.

Madrid, Septiembre de 2015



**Facultad de Medicina
Departamento de Psiquiatría**

JOSÉ MARÍA POVEDA, Profesor del Departamento de Psiquiatría de la
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICO

Que **Norys Margarita Rodríguez de Cruz**, ha realizado bajo mi dirección,
el trabajo “**ESTRÉS PSICOSOCIAL, REACTIVIDAD AL ESTRÉS Y
MARCADORES BIOQUÍMICOS LDL-OXIDADA Y ANTI-HSP60:
SU RELACIÓN EN EL ACV ISQUÉMICO**”

Dicho trabajo reúne a mi juicio las condiciones de originalidad y rigor necesario, por
lo que avalo su presentación para ser juzgada.

Madrid, Septiembre de 2015

DEDICATORIA

*A mi padre, **Julio Rodríguez M.**[†] fuente de inspiración de este trabajo.
Lo que una vez te prometí durante tu enfermedad aquí te lo cumpla.*

*A mi madre, **Graciela Ramos de R.**[†] que nos mostraste otra manera de padecer este tipo de enfermedades.*

*A mis hijos, **María José y Luis José**, por el tiempo que les he robado durante el doctorado y para realizar este trabajo. Siempre cualquier esfuerzo grande o pequeño será por y para ustedes. Igual gracias por su apoyo y confianza.*

*A mi familia **Rodríguez Ramos***

AGRADECIMIENTOS

- *A Dios, por darnos las capacidades para lograr las metas que nos proponemos y ponernos en el camino las oportunidades necesarias.*
- *A la Virgen del Valle, fuente de fe de mi familia.*
- *A los pacientes que aceptaron participar en el estudio y sus familiares; así como las personas que participaron como controles de los mismos; sin ustedes esto habría sido imposible.*
- *Al Dr. José Regino Peña, por hacerme partícipe de su área de investigación, por su paciencia y por las orientaciones brindadas.*
- *A los doctores José María y Jesús María Poveda de Agustín, por su apoyo incondicional al Doctorado.*
- *A las personas que hicieron posible la realización del Doctorado en Patología Existencial e Intervención en Crisis de la Universidad Autónoma de Madrid en nuestra Universidad de Los Andes.*
- *Al Dr. Ramón Nieves, así como al personal del Departamento de Registros Médicos y Estadísticas de Salud del Hospital Tulio Carnevali Salvatierra del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales de la ciudad de Mérida, por su colaboración en la data de pacientes con ACV isquémico.*
- *Al Consejo de Estudios de Post-grado de la Universidad de Los Andes, por el financiamiento otorgado para la adquisición de los reactivos para las determinaciones por ELISA.*

- *Al Lcdo. Lenin Valeri, por permitirme realizar las determinaciones por ELISA en el Laboratorio de Hormonas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, poniendo a disposición todos los instrumentos y equipos necesarios allí presentes.*
- *A las profesoras, compañeros y personal de las asignaturas Bioquímica Clínica y Prácticas Profesionales de la Universidad de Los Andes y el Laboratorio Lavalle, quienes de alguna u otra manera brindaron su apoyo y colaboración. En especial a la Prof. Jeymmy Romina Torres, por su aporte en las determinaciones bioquímicas de rutina efectuadas en el Hospital Sor Juana Inés de La Cruz para la inclusión de los pacientes y controles.*
- *Al Laboratorio Asistencial de Bioquímica Clínica de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Los Andes por sus apoyo como infraestructura para la realización de este trabajo y permitirme efectuar parte de las determinaciones bioquímica de rutina para la inclusión de los pacientes y controles.*
- *Al Prof. Henry Andrade, por su acertada y oportuna orientación en la parte estadística de este trabajo*
- *A todas las personas (familiares y amigos) que me acompañaron a las visitas a los pacientes.*
- *Y a todas aquellas personas que de una u otra forma pusieron un granito de arena para lograr este objetivo.*

A todos, y a los que ahora escapan de mi memoria, infinitas gracias.

Índice General

Cartas de Aprobación	II
Dedicatoria	IV
Agradecimiento	V
Índice General	VII
Índice de Tablas	IX
Índice de Figuras	X
Índice de Gráficos	XI
Resumen	XII
Abstract	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
BASES TEÓRICAS Y ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	12
1.- FACTORES PSICOLÓGICOS Y ACV. EL ÍNDICE GLOBAL DE ESTRÉS	12
2.- FACTORES BIOQUÍMICOS Y ACV. LA ATEROSCLEROSIS. SISTEMAS DE HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	33
CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO	34
TIPO DE INVESTIGACIÓN	36
METODOLOGÍA GENERAL	37
Ila- Población, muestra y criterios de inclusión:	37
Población	38
Muestra	38
Ilb- Técnicas y recolección de datos	40
Instrumento de recolección de datos	40
Determinación del Índice de Reactividad al Estrés (IRE)	41
Cuestionario sobre eventos vitales de Holmes y Rahe	41
Obtención de especímenes	42
Determinaciones de laboratorio	43
Ilc- Pruebas estadísticas	46
CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	47
RESULTADOS	48
1. Comparación del estrés psicosocial	49
2. Comparación del índice de reactividad al estrés	52
3. Comparación de los marcadores bioquímicos	55
4. Correlación entre marcadores bioquímicos y psicológicos	55
5. Estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés, LDL-oxidada y anti-	59

HSP60 como factores de riesgo en la enfermedad cerebrovascular	61
DISCUSIÓN	70
1. Comparación del estrés psicosocial	70
2. Comparación del índice de reactividad al estrés	72
3. Comparación de los marcadores bioquímicos	74
4. Correlación entre marcadores bioquímicos y psicológicos	77
5. Estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés, LDL-oxidada y anti- HSP60 como factores de riesgo en la enfermedad cerebrovascular	78
CONCLUSIONES	83
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	84
ANEXOS	102

Índice de Tablas

	Página
Tabla N° 1. Matriz de datos por variable para pacientes con ACV y sus controles. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	48
Tabla N° 2. Comparación del estrés psicosocial según grupo. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014.	49
Tabla N° 3. Comparación del nivel de estrés psicosocial por grupo. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	50
Tabla N° 4. Comparación del puntaje del índice de reactividad al estrés por grupo. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	52
Tabla N° 5. Comparación del nivel de reactividad al estrés por grupo. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	54
Tabla N° 6. Comparación de los marcadores bioquímicos por grupo. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	55
Tabla N° 7. Correlación entre marcadores bioquímico, estrés psicosocial e IRE. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	59
Tabla N° 8. Puntos de corte percentil 50 para las variables en estudio. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	61
Tabla N° 9. Estrés psicosocial como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV). Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	62
Tabla N° 10. Índice de reactividad al estrés como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV). Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	63

Tabla N° 11	Parámetros bioquímicos como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV). Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014.	64
Tabla N° 12	Estrés psicosocial como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) según sexo. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014.	66
Tabla N° 13	Índice de reactividad al estrés como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) en el sexo femenino. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014.	67
Tabla N° 14	Índice de reactividad al estrés como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) en el sexo masculino. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014.	68
Tabla N° 15	Parámetros bioquímicos como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) según sexo. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014.	69

Índice de Figuras

	Página	
Figura N° 1	SINOPSIS. Interrelación estrés-factores de riesgo de ECeV-ictus	16
Figura N° 2	Development of atherosclerosis.	24
Figura N°3.	Resumen de la hipótesis inmunológica de la aterosclerosis	32

Índice de Gráficos

	Página
Gráfico N° 1 Niveles individuales de estrés psicosocial en pacientes con ACV y sus respectivos controles. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	51
Gráfico N° 2 Diferencias absolutas y porcentuales del índice de reactividad al estrés entre grupos ACV y controles. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	53
Gráfico N°3. Diferencias absolutas y porcentuales de los parámetros bioquímicos entre grupo ACV y controles. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	56
Gráfico N°4. Niveles individuales de LDL-oxidada en pacientes con ACV y sus respectivos controles Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	57
Gráfico N°5. Niveles individuales de anti-HSP60 en pacientes con ACV y sus respectivos controles Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	58
Gráfico N°6. Correlación entre LDL-oxidada y anti-HSP60. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	60
Gráfico N°7. Análisis de correspondencia múltiple para puntos de cortes en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV). Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014	65



Facultad de Medicina
Departamento de Psiquiatría
ESTRÉS PSICOSOCIAL, REACTIVIDAD AL ESTRÉS Y MARCADORES
BIOQUÍMICOS LDL-OXIDADA Y ANTI-HSP60:
SU RELACIÓN EN EL ACV ISQUÉMICO
Norys M. Rodríguez Ramos
Resumen

A objeto de comparar y relacionar el estrés psicosocial, el índice de reactividad al estrés, la LDL oxidada y anticuerpos anti-HSP60 en individuos con enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) y sus respectivos controles (con similar edad y sexo), a 32 individuos de cada grupo les fue medido el estrés psicosocial por la escala de Holmes y Rahe para los eventos vitales sucedidos durante el año anterior a la isquemia cerebral (ACV) o al presente estudio (controles), y el índice de reactividad al estrés mediante el test de estrés de González de Rivera; así como las concentraciones en suero de LDL-oxidada y anti-HSP60 por el método de ELISA. Se empleó la prueba t de muestras independientes para comparar las medias; chi-cuadrado para comparar la severidad y la incidencia de la enfermedad; correlación de Pearson para medir la relación lineal entre las variables; Odds Ratio para determinar factores de riesgo y análisis de correspondencia múltiple para caracterizar los puntos de corte de los factores de riesgo. Los niveles promedio de todos los parámetros fueron significativamente superiores en los individuos con ACV ($P < 0,05$), y al comparar individualmente, dicho grupo presentó entre 78,13% a 98,53% de individuos con mayor nivel de cada uno de los parámetros, que su respectivo control. Se detectó una correlación positiva entre la LDL-oxidada y el estrés psicosocial ($r=0,400$), IRE-total ($r=0,400$) y cada uno de sus componentes (r vegetativo: 0,330, emocional: 0,390, cognitivo: 0,310, conductual: 0,350); mientras que los anti-HSP60 correlacionaron positivamente con el estrés psicosocial ($r=0,420$), IRE-emocional ($r=0,250$) e IRE cognitivo ($r=0,280$). Igualmente, hubo correlación positiva entre LDL-oxidada y anti-HSP60 ($r=0,204$). Se detectaron puntos de corte para cada parámetro que permitieron establecer porcentajes de incidencia para ACV isquémico superiores en el grupo de pacientes, revelando mayor probabilidad a padecer la enfermedad cerebrovascular al presentarse niveles por encima de los mismos y marcada diferenciación entre los grupos. De ello, se concluyó que, para la población estudiada, los factores psicológicos evaluados inducen la elevación de los niveles de LDL-oxidada y anticuerpos anti-HSP60, involucrándose todos en la etiopatogenia de la enfermedad cerebrovascular; por lo que, los parámetros psicológicos y bioquímicos evaluados en esta investigación pueden ser considerados como factores de riesgo al ACV isquémico; indicando la necesidad de esta población de tener en cuenta medidas preventivas para su control.

Palabras clave: Estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés, LDL oxidada, anticuerpos anti HSP60, factores de riesgo, aterosclerosis, ACV.



**Facultad de Medicina
Departamento de Psiquiatría
PSYCHOSOCIAL STRESS, REACTIVITY TO STRESS AND BIOCHEMICAL
MARKERS LDL-OXIDIZED AND ANTI-HSP60:
THEIR RELATIONSHIP IN THE ISCHEMIC STROKE
Abstract**

In order to compare and to relate the psychosocial stress, the rate of reactivity to stress, the oxidized-LDL and antibodies anti-HSP60 in individuals with disease ischemic stroke (DIS) and their respective controls with similar age and sex; to 32 individuals of each group it was measured the psychosocial stress by Holmes and Rahe scale for vital events that occurred during one previous year to the cerebral ischemia (stroke) or of the present study (controls) and was applied to them the stress test of González de Rivera for determination of reactivity to stress index; as well as the concentrations in serum of the oxidized-LDL and the anti- HSP60 by ELISA method. Was used independent samples t test to compare the means; Chi-square to compare the severity and incidence of disease; Pearson's correlation to measure the linear relationship between the variables; Odds Ratio to determine risk factors and multiple correspondence analysis to characterize the breakpoints in the risk factors. Average levels of all parameters were higher in individuals with DIS ($P < 0,05$), and when they were compared individually, the DIS group showed between 78,13% to 98,53% individuals with higher levels of each one of these parameters than their respective control. It was detected a positive correlation between the LDL-oxidized and the psychosocial stress ($r = 0,400$), IRE-total ($r = 0,400$) and each one of its components ($r =$ vegetative: 0,330, emotional: 0,390, cognitive: 0,310, behavioral: 0,350); while the anti-HSP60 showed correlation positively with psychosocial stress ($r = 0,420$), IRE-emotional ($r = 0,250$) and cognitive IRE ($r = 0,280$). Equally, there was positive correlation between anti-HSP60 and oxidized-LDL ($r = 0,204$). Cutoff points for each parameter were detected that allowed to establish percentages of incidence for ischemic stroke higher in the group of patients, revealing more likely to suffer cerebrovascular disease if the levels are higher than the same, and marked differentiation between groups. Therefore, it was concluded that, for the studied population, evaluated psychological factors induce the elevation of the levels of LDL-oxidized and antibodies anti-HSP60, involving everyone in the aetiopathogenesis of cerebrovascular disease; so, the psychological and biochemical parameters evaluated in this research can be considered as the ischemic stroke risk factors; indicating the need for this population take preventive measures account for its control.

Key words: Stress psychosocial, rate of reactivity to stress, oxidized LDL antibodies anti HSP60, risk factors, atherosclerosis, stroke

INTRODUCCIÓN

El cerebro recibe un 25% del oxígeno del cuerpo, pero no puede almacenarlo, sus células requieren un aporte constante del mismo para mantenerse sanas y funcionar correctamente; por lo que, requiere que la sangre llegue continuamente. Así que, una reducción del flujo sanguíneo durante un período de tiempo ocasiona la interrupción del suministro de oxígeno a las células, provocando la muerte (infarto) del tejido vital que, en este caso, se conoce como accidente cerebrovascular (ACV), también denominado, Apoplejía, Ictus o Stroke (Fabregas & Valero, 2001).

Los efectos de la isquemia pueden ser leves o graves, transitorios o permanentes y su gravedad dependen de: la región del cerebro que haya sido afectada, la extensión del daño en las células cerebrales, la rapidez con la que el organismo logra restablecer el flujo sanguíneo a las partes lesionadas del cerebro y la rapidez con la que las zonas intactas del cerebro logran compensar, suplir o asumir las funciones que antes eran realizadas por la zona lesionada (Centro de Información Cardiovascular del Texas Heart Institute, 2014a).

El ACV es considerado la mayor causa contribuyente a morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Abdalla et al., 2007; De la Serna, 2004; Herrera & Delgado, 2007; Ministerio de Salud, 2013); así como, la principal causa de discapacidad severa, ya que alrededor de un 60% de los pacientes que sobreviven al mismo padecen de

discapacidad física y psicológica a largo plazo (Roldan et al., 2006); constituyéndose en un verdadero problema de salud pública (Vivar, 2009).

Esta enfermedad ha aumentado su incidencia en casi un 50% en los últimos 10 años en los países en desarrollo (Aidar et al., 2007; De La Serna, 2004). Es la tercera causa de muerte en el mundo (Fernández, Buergo & López, 2012; Organización Mundial de la Salud, 2014), al respecto de lo cual, la Organización Mundial de la Salud ha estimado que para el 2015 morirían cerca de 20 millones de personas por enfermedades cardiovasculares, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares (De La Serna, 2004; Organización Mundial de la Salud, 2009) y que en países de bajos y medianos recursos la cifra de muertes por ACV ascenderá a 6,3 millones para el 2015, y a 7,8 millones para el 2030 (Fernández, Buergo & López, 2012).

De allí que, estas enfermedades pudieran ser consideradas una epidemia en estos tiempos; haciendo pertinente la reflexión del anatomopatólogo alemán Virchow (1821-1902): *“Cuando una enfermedad ocurre en forma masiva, refleja problemas de la cultura”*; de modo que habría que preguntarse acerca del trasfondo cultural que supone este tipo de enfermedades (Costa, Barontini, Forcada, Carrizo & Almada, 2010).

A su vez, Estrada & Estrada (2008) indican: *“La historia de las epidemias es la historia de los disturbios de la cultura humana”* al relacionar los factores de riesgo a

la enfermedad aterotrombótica. Esta afirmación puede ser relacionada con los tipos de ACV; ya que los de tipo isquémico son los más frecuentes, presentándose en el orden del 80-85% y son causados por obstrucción de la arteria irrigadora, la cual puede ser ocasionada por un coágulo que se forma en el interior de alguna de las arterias del cerebro (trombosis) o que son arrastrados por la sangre desde otros desplazamientos (embolia), conociéndose que 2/3 de los ACV están causados por la formación de trombos y émbolos en la región de la bifurcación de la arteria carótida (Roldán et al., 2006). Cualquiera sea el caso, dichos coágulos terminan obstruyendo el vaso sanguíneo en algún punto afectado por estenosis ocasionada por aterosclerosis (Centro de Información Cardiovascular del Texas Heart Institute, 2014b).

Es bien conocido que la aterosclerosis se caracteriza por la presencia de depósitos de lípidos en la capa íntima de las arterias, ya sea de grande, mediano o de pequeño calibre, produciendo con el tiempo y la contribución de efectos inflamatorios, ambientales, genéticos y otros factores precipitantes, la formación y/o ruptura de la denominada placa aterosclerosa o placa de ateroma (Cirpa, 2013; Peña, 2009).

Uno de los precursores de la formación de estas placas es la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL-Ox), la cual mediante la atracción de otras células y sustancias químicas en el sitio, causa inflamación en la arteria (Cirpa, 2013); existiendo diversos estudios dirigidos a identificar a la LDL-Ox como pro-aterogénica

y pro-inflamatoria, e inclusive inmunogénica, al provocar la generación de auto-anticuerpos séricos anti-LDL-Oxidada (Ruíz et al., 2011).

Este hecho se asocia al surgimiento de la hipótesis inmunológica de la aterosclerosis de Knoflach, Bernard & Wick (2005), que sugiere que el estrés oxidativo ocasionado por estresores biomecánicos (como la hipertensión arterial, estrés turbulento en los puntos de bifurcación del vaso), citoquinas (tales como el factor tumoral de necrosis [FTN-alfa] o la LDL-oxidada pueden alterar químicamente algunas proteínas protectoras, como la proteína de shock térmico HsP60 humana, para hacerla inmunogénica e inducir una reacción autoinmune, de manera que los anticuerpos y las células T que son formados en contra de esta proteína de “heat-shock” (HsP60) por infecciones recurrentes, pueden hacer reacción cruzada con la HsP60 humana expresada en las células endoteliales estresadas (Peña, 2009).

Estos procesos de estrés oxidativo han sido interrelacionados con procesos cognitivos, emocionales y sociales, así como las variables biológicas y psicológicas en los estudios de Mayoral et al. (2005) en personas mayores.

Así, tomando en cuenta, la expresión de Moscoso (2009): *“El gran reto de la medicina, en este siglo, es seguir mejorando nuestro conocimiento acerca del impacto negativo del estrés crónico sobre los sistemas nervioso, endocrino, e inmune...”*, en el presente trabajo se compara el índice global de estrés, asociando los niveles del estrés psicosocial ocasionado por los sucesos o eventos vitales por

los que atraviesa el individuo y la manera en que el individuo responde ante los estresores, conocido como reactividad al estrés, así como los marcadores bioquímicos LDL-oxidada y anti-HSP60 en un grupo de individuos que había padecido ACV isquémico al respecto de un grupo control aparentemente sano. De igual manera, se interrelacionan estas variables, a la vez que se valoran como factores de riesgo para la enfermedad cerebrovascular isquémica.

La investigación estuvo dirigida por el Dr. José Regino Peña (de la Universidad de Carabobo-Venezuela) y por el Dr. José María Poveda (de la Universidad Autónoma de Madrid-España). La misma fue realizada en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, entre Noviembre del año 2009 y Octubre del año 2014, en individuos que fueron atendidos y diagnosticados con ACV isquémico en el Hospital Tulio Carnevali Salvatierra del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales de la ciudad de Mérida y sus respectivos controles aparentemente sanos, pareados por edad y sexo, originarios de esta misma ciudad.

El trabajo se ha estructurado en 3 capítulos, de la siguiente manera: El capítulo I contiene los aspectos del marco teórico del tema en estudio: se plantea el problema de la investigación, se resumen los antecedentes y bases teóricas, además se enuncian las hipótesis y se establecen los objetivos de la misma; en el capítulo II se describen los componentes del marco metodológico empleado; en el capítulo III se presentan los resultados obtenidos y se realiza la discusión de los mismos, para finalizar con las conclusiones.

CAPÍTULO I.
MARCO TEÓRICO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los factores de riesgo de una enfermedad se refieren a características o circunstancias personales, ambientales o sociales, que al actuar en forma persistente sobre los individuos, aumentan la probabilidad de que el evento no deseado ocurra (Castillo et al., 2005).

En el caso de las enfermedades vasculares, los estudios han conducido al concepto del “riesgo global”, que ya ha sido ampliamente descrito para determinar las posibilidades de esta enfermedad a 10 años; fundamentalmente para los factores de riesgo tradicionales (Estrada & Estrada, 2008).

Para estas enfermedades, como factores de riesgo se han descrito: dislipidemias, hipertensión arterial, diabetes, obesidad (mayormente de tipo abdominal), discrasias sanguíneas, tabaquismo, hipertrofia ventricular izquierda, infarto de miocardio, fibrilación auricular, insuficiencia coronaria, edad avanzada; lo favorecen ciertos hábitos de conducta, como el sedentarismo, consumo de café, tabaco, alcohol, anfetaminas, cocaína e inclusive algunos medicamentos (De la Serna, 2004; Estrada & Estrada, 2008). Además; han surgido los factores no tradicionales, como: hiperhomocisteinemia y deficiencia de vitaminas del complejo B, hiperfibrinogenemia, incrementos de la PCR e hiperlipoproteinemia A (Comisión de Nuevos Factores de Riesgo 2001; Estrada & Estrada, 2008).

A su vez, se describen factores de riesgo emergente y tratables, de índole microbiológico: infecciones por *Helicobacter pilori*, *Citomegalovirus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Herper zoster* (Abdalla et al., 2007; Ameriso, Ruiz & Pérez, 2004; Escosa et al., 2004), los cuales incrementan el riesgo a ACV por distintos mecanismos fisiopatológicos, indicando que su detección y control pueden contribuir en el manejo de la enfermedad aterotrombótica y que la búsqueda de infecciones recientes debería constituirse en una rutina en estos pacientes (Ameriso, 2009).

Ahora bien, William Osler ya para 1892 afirmaba: *“La preocupación y la tensión de la vida moderna, la degeneración de las arterias no sólo es común, sino que aparece a edades tempranas. Por eso creo que las altas presiones con las que vive el hombre y el hábito de hacer trabajar la máquina a su máxima capacidad son los responsables, más que los excesos en la alimentación y la bebida”*. Esa tensión, hoy se denomina estrés (León, Sánchez & Matiz, 2009).

De manera que, a los ya descritos factores de riesgo, se unen los factores mentales y emocionales, destacando el estrés y la depresión (León, Sánchez & Matiz, 2009).

Al respecto de la depresión, el estudio efectuado por Salaycik et al. (2007) mostró resultados que indican una asociación entre la sintomatología depresiva y el incremento a riesgo de ACV en individuos menores a los 65 años; advirtiendo la necesidad de determinar el mecanismo fisiopatológico de este hecho.

Por otra parte, el estrés fue definido por Seyle (1907-1982) como la respuesta no específica del organismo a demandas externas, considerando que algunas enfermedades eran consecuencia de los cambios fisiológicos que resultan de un estrés prolongado. Desde el punto de vista clínico, este es considerado como una respuesta adaptativa de los sistemas del organismo; entre ellos el endocrino, nervioso y respiratorio, a los estímulos internos y externos, llamados “estresores” (Mucio, 2007).

Así, la exposición breve e intensa a agentes lesivos genera estrés que aparece en forma súbita, fácil de identificar y generalmente reversible y las enfermedades que habitualmente se observan son: úlcera por estrés, estados de shock, neurosis post-traumática, estado post-quirúrgico. Mientras que las exposiciones prolongadas (meses o años), o estrés crónico, conducen a enfermedades permanentes; siendo las más frecuentes: migraña, gastritis, insomnio, depresión, agresividad, hipertensión arterial, trastornos sexuales, adicciones, conductas antisociales, psicosis severas, infarto al miocardio e infarto cerebral (Mucio 2007).

En este orden de ideas, ya desde 1989 González, Morera & Monterrey habían considerado el índice global de estrés como predictor de enfermedad, basándose en el concepto psicosocial de «factores de estrés», dentro de los que se consideran factores internos y externos.

Los factores internos de estrés están constituidos por variables propias del individuo, directamente relacionadas con la respuesta al mismo y con la adaptación, defensa y neutralización de los factores externos de estrés. Así, la reactividad al estrés, cuantificada mediante el Índice de Reactividad al Estrés (IRE) de González de Rivera, es una variable típica de este grupo (González, Morera & Monterrey, 1989).

Dentro de los factores externos de estrés se encuentran variables del ambiente susceptibles de alterar el equilibrio del medio interno o sobrecargar los mecanismos de defensa y regulación homeostática del organismo; siendo los acontecimientos vitales un elemento típico de este grupo, los cuales se objetivan, por ejemplo, con la escala de Holmes y Rahe (González, Morera & Monterrey, 1989). Así, se ha demostrado que dichos eventos vitales, marcadores de estrés psicosocial, están asociados a incremento en la morbilidad (Campo, Reyes, Ortiz, Quintero & Herrera, 2006; González, 1991; González, Morera & Monterrey; 1989; Holmes & Rahe, 1967). Dentro de ello, cabe mencionar, entre otros, los estudios efectuados por Peña (2009) en hombres y Quintini (2008) en mujeres, los cuales determinaron que los eventos vitales que preceden a la aparición de la cardiopatía isquémica podrían representar un factor de riesgo para la presentación y desarrollo de la misma.

No obstante, los resultados de los trabajos sobre el papel que desempeñan los acontecimientos vitales estresantes como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular, aparte de escasos, no han sido concluyentes. Ello, debido a importantes problemas metodológicos y/o el empleo de diferentes escalas para medir

el estrés; así como lo subjetivo de su apreciación, que han hecho cuestionable la interpretación y han dificultado la comparación de los resultados entre ellos (Fernández, Verdecie, Chávez, Alvarez & Fiallo, 2002).

Por otra parte, el estrés psicológico es fuente exógena de radicales libres y, por tanto, de los procesos de estrés oxidativo (Wright, Cohen & Cohen, 2005) donde se generan moléculas de la LDL-colesterol oxidada, factor primordial en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica (Escosa et al., 2004; Pereira et al., 2000) y ésta a la enfermedades cerebrovascular y ACV isquémico (Abdalla, 2007).

Dicha enfermedad aterosclerótica se ha demostrado que iniciada por inmunidad celular y humoral contra la proteína de choque térmico 60 (HSP60), una proteína de estrés filogenéticamente muy conservada, la cual ha mostrado correlación con la ocurrencia y extensión de lesiones ateroscleróticas (Knoflach, Bernard & Wick, 2005).

Por tanto, el estudio de estos marcadores bioquímicos podría mostrar cómo se relacionan el estrés oxidativo y el estrés psicológico en el proceso de esta enfermedad (Sabater, 2004), planteándose, en este caso la interrogante de la posibilidad de interrelación entre los factores del índice global de estrés (estrés psicosocial y reactividad al estrés), como factores psicológicos con la concentración sérica de anticuerpos circulantes anti-HSP60 y de la LDL-oxidada, como marcadores de estrés oxidativo en individuos con ACV isquémico y sus diferencias con los

respectivos controles pareados por edad y sexo, de modo tal que si pudieran proponerse como factores de riesgo no tradicionales de ésta.

BASES TEÓRICAS Y ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.

1.- FACTORES PSICOLÓGICOS Y ACV. EL ÍNDICE GLOBAL DE ESTRÉS

Los vacíos que han dejado los factores de riesgo clásicos, hacen referencia al estrés psicosocial y a las diferencias individuales en la percepción de los estímulos ambientales estresantes. Estos factores psicológicos tienen un papel modulador sobre los factores clásicos de riesgo, los cuales son en su mayoría biológicos (Iacovella & Troglia, 2003). Es así, como estos factores de riesgo psicológicos vienen suscitando un gran interés en los diversos investigadores, debido a la alta influencia que han mostrado en el origen, aparición y mantenimiento de las enfermedades (Aguayo, 2007; Fernández, et al., 2002).

En este contexto, Herrera & Delgado (2007; 2008) señalan la controlabilidad como un factor de riesgo para el desarrollo de los ACV. Esta entidad estaría dada por un fenómeno psicológico complejo que matiza la relación sujeto-medio, de modo que la persona pretende controlar hechos significativos que le demandan una reestructuración perturbadora de su equilibrio gratificador y en el cual convergen aspectos perceptivos, valorativos y reguladores, del medio y del ser, evidenciándose la unidad cognitivo-afectivo-volitivo.

Además, los estudios realizados por Surtess et al (2008) en miles de casos, así como el de Jeffrey (2008) señalan que el aumento de estrés psicológico se asocia con un mayor riesgo de accidente cerebrovascular.

Por otra parte, De La Serna (2004) señala el temperamento iracundo, expresión de hostilidad y patrón de conducta Tipo A en la etiopatogenia del ACV. Este patrón de conducta es descrito como un constructo psicológico, referido a un conjunto de comportamientos de impaciencia, competitividad, sobrecarga, dependencia social, pérdida de control y hostilidad, entre los más importantes que, en algunos estudios, ha mostrado relación con enfermedades coronarias (Moyano et al., 2011).

Este constructo estaría constituido por 5 dimensiones: (a) componentes formales como alto volumen de voz, rapidez al hablar, evidente actividad psicomotora, (b) conducta manifiesta expresada en urgencia en el tiempo, velocidad, hiperactividad, (c) aspectos motivacionales, descritos como motivación de logro, éxito y ambición, competitividad, (d) actitudes y emociones que incluyen hostilidad, ira, impaciencia y agresividad, y (e) aspectos cognitivos como necesidad de control ambiental y estilo atribucional interno (Moyano et. al., 2011).

En este tipo de conducta, se presenta la reactividad psicofisiológica como conducente al daño arterial, debido a que estos individuos responden habitualmente a las demandas del entorno, aumentando la actividad del sistema nervioso simpático

de modo que su constante sobrecarga de actividad se cree puede precipitar un evento cardiovascular (Fernández et al., 2002; Moyano et. al., 2011).

Así, además de este tipo de conducta ya descrito, Fernández et al. (2002) estudiaron en un grupo de individuos que había padecido ACV isquémico, los eventos vitales sucedidos un año previo al infarto cerebral; concluyendo que el estrés psicosocial, derivado de acontecimientos vitales estresantes, aumenta el riesgo a padecer el mismo en individuos hipertensos o con patrón de conducta de tipo A.

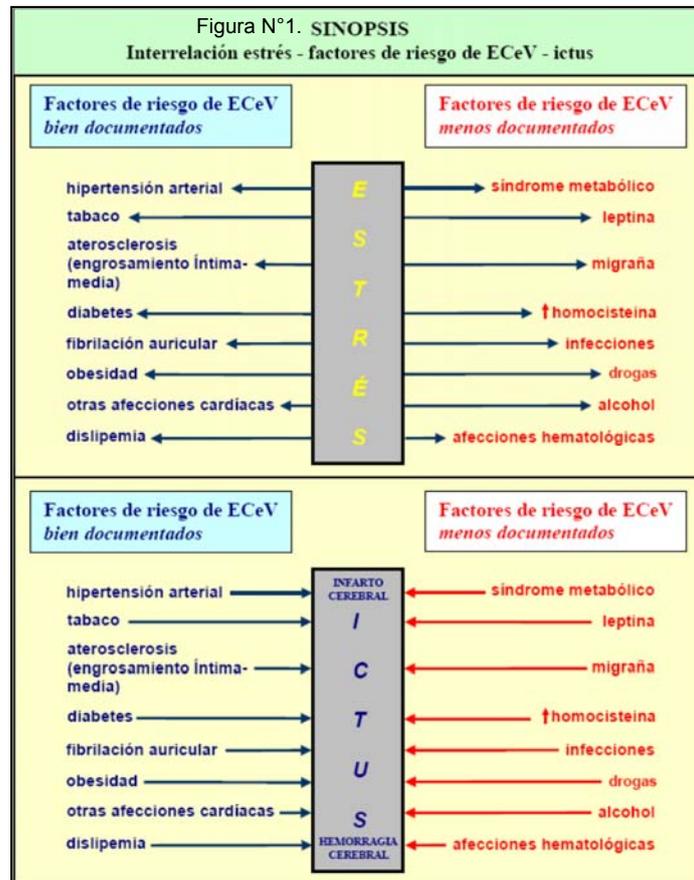
De igual manera, en la edición en línea del 29 de agosto de 2011 de la revista *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, se publicó un trabajo donde se estudió el estrés en relación con el riesgo de ACV. En dicho estudio se compararon los factores de riesgo del ACV, que incluían los niveles de estrés, medidos con herramientas estandarizadas para evaluar los eventos vitales importantes, la ansiedad y la depresión, el bienestar general y el tipo de personalidad; encontrando que haber sufrido un evento vital estresante importante en el año anterior cuadruplicaba el riesgo de ACV mientras que tener una personalidad tipo A duplicaba las probabilidades (Mann, 2011).

En este sentido, ya para 1967 Holmes & Rahe habían diseñado una escala para evaluar una serie de acontecimientos que guardan relación con la aparición y desarrollo de enfermedades orgánicas y mentales. La misma evalúa los factores externos de estrés, o estrés psicosocial, mediante una puntuación relativa al grado

de cambio vital y esfuerzo de readaptación necesarios tras ser experimentados una serie de acontecimientos vitales estresantes (González, 1991).

Esta escala fue adaptada por González y Morera (1983a) debido a las diferencias de valoraciones que pudieran tener para su población cada parámetro (González y Morera, 1983b) y ha sido utilizada en diversos estudios hasta la actualidad, donde se asocian a ciertas patologías; ejemplo de lo cual son, entre otros, el trabajo de Campo, Reyes, Ortiz, Quintero & Herrera (2006), en el cual correlacionaron el estrés psicosocial y los niveles de presión arterial en adultos jóvenes en estudiantes de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (Colombia). Así como, los trabajos de Peña (2009) y Quintini (2008) en hombres y mujeres, respectivamente, en los cuales demostraron relación entre los vitales de la escala de Holmes y Rahe con la cardiopatía isquémica y el de Mora (2010) en individuos con disfunción temporomandibular.

Dentro de este contexto psicológico, Plaza (2007) indica que el estrés puede ser considerado como un “factor de riesgo” de otros factores de riesgo, debido a su implicación en el desarrollo de la aterosclerosis, de la hipertensión, y otras conductas de riesgo cardiovascular; planteando además, un esquema de la interrelación del estrés con el accidente cerebrovascular, donde denota la influencia del estrés sobre factores de riesgo ya documentados y; a su vez, la repercusión de estos sobre el ACV (Figura N°1)



Tomado de: Plaza, A. (2007). Riesgos psicosociales. Repercusión neurológica del estrés. http://neurologiadeltabajo.sen.es/pdf/drplaza_2007.pdf

Otros estudios han descubierto una asociación entre el estrés mental prolongado y un estrechamiento progresivo de la carótida, debido entre otras cosas al incremento de la presión arterial (Naqvi & Hyuhn, 2009; www.geosalud.com), ocasionada por la liberación de catecolaminas que el estrés agudo genera (Campo et al., 2006); siendo ésta considerada como el factor de riesgo más importante para el ACV (Navarrete, Huertas, Rozo & Ospina, 2009; Plaza, 2007; Ruiz, González & Suárez, 2002) y más estudiado en las investigaciones sobre estrés laboral (Serrano, Moya & Salvador, 2009).

El riesgo a ACV incrementa de manera constante con el nivel de estrés, mientras que la relación no cambia cuando se toman en cuenta otros factores de riesgo, como fumar, la presión arterial, la obesidad, la diabetes y los antecedentes familiares. Además, de que este mecanismo se relaciona con la capacidad de adaptación al estrés psicológico (www.geosalud.com).

Ahora bien, estos hechos van a depender de la vulnerabilidad al estrés de cada individuo (Medialdea & Medina, 2007), de su perfil psicológico o personalidad (León, Sánchez & Matiz, 2009; Slipak, 1994) y su resiliencia, definida por diversos autores como la capacidad humana para enfrentar, sobreponerse y ser fortalecido y transformado por experiencias de adversidad (Costa et al., 2010; Yépez, 2011).

De manera que, los individuos difieren considerablemente en la manera en que manejan las circunstancias estresantes (Mucio, 2007). Por lo que, en este sentido, se deben considerar los factores internos de estrés, conformados por variables propias del individuo y que pueden ser cuantificadas mediante el índice de reactividad al estrés (IRE) (González, Morera & Monterrey, 1989).

Este índice ha sido definido como el conjunto de pautas habituales de respuestas de tipo neurovegetativas, cognitivas, conductuales y emocionales características del individuo ante situaciones que percibe como nocivas, peligrosas o desagradables (de estrés o tensión nerviosa) (Monterrey, González, de las Cuevas & Rodríguez, 1991) y

fue diseñado con la finalidad de cuantificar dichas pautas de respuesta (Valdes, Rodríguez, Arroyo & Lanzarote, 2003).

A ese respecto, existen investigaciones, como la de Henry et al. (1991) efectuada con el propósito de cuantificar el Índice de Reactividad al Estrés en una muestra de pacientes asmáticos crónicos, donde los niveles del mismo fueron superiores al de pacientes psiquiátricos ingresados. Así como, el trabajo de Rodríguez et al. (1999), cuyos resultados mostraron que la reactividad al estrés de los sujetos con disfunción temporomandibular fue significativamente mayor que la de los controles no clínicos, aunque menor que la de los psiquiátricos. De igual manera, el trabajo de Mora (2010) que concluyó que los promedios de IRE total y en todas sus facetas del grupo con disfunción dolorosa temporomandibular fueron superiores a los índices respectivos obtenidos por el grupo control y permite afirmar que la reactividad al estrés en sus facetas vegetativo, emocional, cognitivo y conductual así como en su IRE total, influye en esta patología.

Ahora bien, González, Morera & Monterrey (1989) indican que la relación entre los eventos vitales y la reactividad al estrés son aditivas, y que su consideración conjunta permite establecer un “Índice Global de Estrés” (IGE) que es mejor predictor del estado de enfermedad que los acontecimientos vitales o el IRE por sí solos. Así, ambas variables elevadas se constituyen en un mayor riesgo, ambas en niveles bajos representarían menor riesgo para el sujeto; mientras que, una variable elevada y la otra baja, sería un riesgo intermedio.

2.- FACTORES BIOQUÍMICOS Y ACV. LA ATEROSCLEROSIS.

La respuesta del organismo ante situaciones de estrés, depende del tipo de estresor, su duración e intensidad, y constituyen un ejemplo de integración neuroendocrina, ya que ante ello se desencadenan una serie de reacciones que preparan al organismo a la respuesta de huida, miedo o enfrentamiento (Joseph & Gortari, 2007).

Los estresores físicos alteran el estado fisiológico afectando mecanismos homeostáticos, activando la vías nerviosas que llegan a núcleos localizados en la parte superior de la médula espinal y en el tallo cerebral e incitan una respuesta rápida y necesaria para la supervivencia, pero no requieren mayor interpretación por estructuras superiores del cerebro; mientras que los estresores psicológicos son estímulos que amenazan el estado actual del individuo o provocan un estado de anticipación aun cuando no representen una amenaza inmediata a las condiciones fisiológicas; necesitan ser procesados por la corteza antes de iniciar la respuesta al estrés para tener un significado fisiológico, y dependen en gran medida de experiencias previas (Joseph & Gortari, 2007).

Es así como, a nivel orgánico en general, el estrés continuo desestabiliza la homeostasis, y como consecuencia de ello, se genera un carga alostática que ocasionan daño a nivel fisiológico y cerebral (Mucio, 2007). Este afecta indicadores biológicos y diversos parámetros inmunológicos; por lo que, en la actualidad, se estudian ampliamente los sistemas endocrino e inmune en las investigaciones

asociadas al estrés (Serrano et al. (2009); considerándose actualmente la *psiconeuroinmunoendocrinología* como una disciplina científica que estudia, documenta y comprende los diferentes mecanismos de regulación y control que se establecen en la intercomunicación de los sistemas psíquico, nervioso, endocrino e inmune de los seres humanos, proponiendo así un modelo integrador que permite retomar los factores biopsicosociales y la interacción mente-cuerpo-ambiente en los procesos de salud-enfermedad (Hurtado, 2015).

A nivel endocrino, se ha integrado la respuesta hormonal en dos fases: en la primera aumentan las hormonas catabólicas: cortisol, catecolaminas y estimulante del tiroides (TSH) y se inhiben las anabólicas: insulina estrógenos y andrógenos. Mientras que en la segunda, cuando el individuo estabiliza sus respuestas frente al estresor, las hormonas catabólicas se normalizan y se restablece la secreción de las anabólicas, las cuales pueden en ocasiones incrementar sobre los niveles de referencia (Duval, González & Hassen, 2010; González, 2010). Como consecuencia importante de este desbalance hormonal, a causa del estrés crónico, se desarrolla el síndrome metabólico, definido como la presencia de al menos tres de las siguientes características: obesidad abdominal, niveles basales de triglicéridos superiores a 150 mg/dL, niveles colesterol de la HDL inferior a 40 mg/dL en hombres y 50 mg/dL en la mujer, glicemia en ayunas superior a 110 mg/dL y presión arterial por encima de 130/85 mm Hg (González, 2010).

La liberación de los principales mediadores del estrés, catecolaminas y glucocorticoides facilita la producción de células del sistema inmune que se dirigen a diferentes regiones del organismo para la defensa ante infecciones o para la respuesta inmune (Mucio, 2007). Además, estas hormonas, pueden activar mecanismos pro y antiinflamatorios, dependiendo de la naturaleza, intensidad y duración del estímulo estresante; habiéndose podido demostrar cómo un mismo estímulo estresante puede generar paralelamente la síntesis y actividad de mediadores pro y antiinflamatorios, como en el caso de las prostaglandinas (García & Leza, 2008).

A su vez, el estrés psicológico es fuente exógena de radicales libres y, por tanto, de los procesos de estrés oxidativo (Wright, Cohen & Cohen, 2005), conociéndose que éste produce una «alteración del equilibrio entre sustancias pro-oxidantes y antioxidantes que favorece la formación de sustancias oxidantes que provocan alteraciones celulares» y, por lo tanto, la pérdida de este equilibrio subyace a la enfermedad (Mayoral, et al., 2005).

En este sentido, dados los trabajos de diversos grupos de investigación, hay una serie de procesos patológicos que han sido atribuidos al ataque de radicales libres, dada su implicación en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas; siendo los más significativos, entre otros: el envejecimiento, cáncer, diabetes mellitus, insuficiencia renal aguda y crónica, insuficiencia hepática, y la aterosclerosis (Elejalde, 2001).

En relación a la aterosclerosis, ésta es considerada un proceso activo, no degenerativo, largo y lento, que es bien conocido por cursar con la formación de placas de ateroma en el sistema arterial con la participación de elementos característicos de la inflamación crónica, así como mecanismos celulares (células endoteliales, monocitos, células de músculo liso y plaquetas) y moleculares (alteración de la lisura endotelial y lesión con aumento de la permeabilidad) de distinta relevancia, que pueden transcurrir sin sintomatología hasta estadios avanzados en los que se manifiestan complicaciones coronarias, cerebrales, digestivas o enfermedades oclusivas de las arterias periféricas (Boronat et al., 2005).

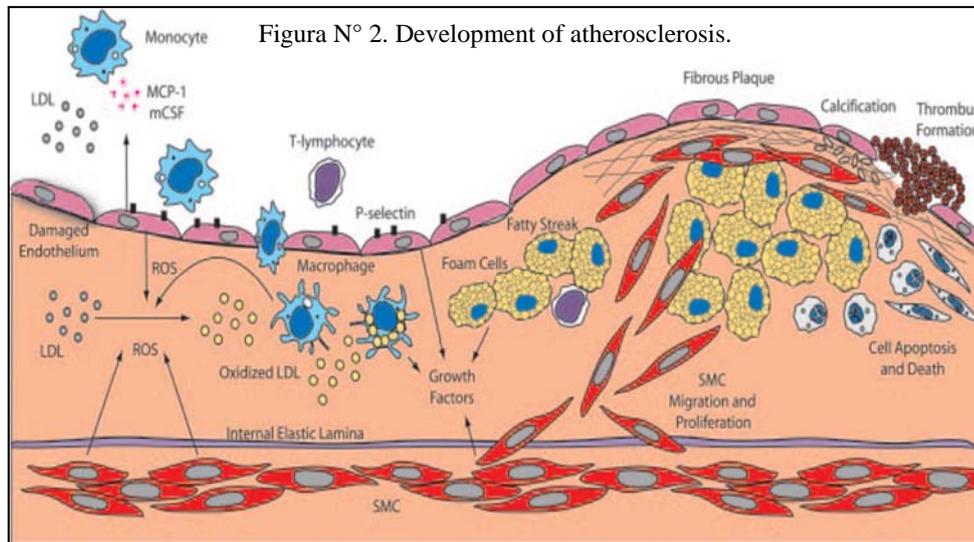
Los factores de riesgo convencionales explican menos del 50 por ciento de esta enfermedad; hecho que es probable esté asociado a nuevos factores bioquímicos y genéticos, los cuales además podrían explicar la variación que existe entre los diferentes grupos étnicos, entre otros; de allí que, los avances recientes en la comprensión de la patogénesis de la enfermedad vascular aterosclerótica han estimulado el interés en los llamados nuevos factores de riesgo (Celis, Hernández & King, 2006).

No obstante, factores de riesgo ya ampliamente identificados, como hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo, pueden actuar induciendo el desequilibrio entre pro-oxidación y anti-oxidación (Elejalde, 2001). De manera que, es una de las patologías asociadas a estrés oxidativo más estudiada durante los años, con gran

prevalencia en todo el mundo, ya que es una de las causas más importantes de muerte y discapacidad a este nivel; en la mayoría de los casos, permanece silente para convertirse en uno de los principales factores de riesgo para ACV (Celis, Hernández & King, 2006).

El proceso de la aterosclerosis se produce por una interrelación muy estrecha de múltiples mecanismos fisiopatológicos, que incluyen disfunción del metabolismo de los lípidos, activación plaquetaria, trombosis, disfunción endotelial, inflamación, estrés oxidativo, activación de células musculares lisas vasculares, alteración de la matriz metabólica, remodelamiento y otros factores genéticos (Faxon et al., 2004).

Para explicar su patogenia, la teoría más aceptada es la teoría oxidativa (Figura N° 2), que considera la lesión arterial inicial, la estría grasa y su progresión a placa de ateroma íntimamente asociadas a la acumulación de macrófagos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que han sido mínimamente oxidadas y participan en el desarrollo inicial de aterosclerosis y en la respuesta oxidativa al proceso inflamatorio (Boronat et al., 2005; Fenollar, Parra, Albaladejo & Casinello, 2005).



Tomado de: Madamanchi, N., Vendrov, A. & Runge M. (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25, 30. "Especies reactivas de oxígeno producidas por células endoteliales macrófagos y LDL oxidada en el espacio sub-endotelial, en los sitios de daño endotelial, inician eventos que culminan en la formación de una placa fibrosa. La ruptura de la placa fibrosa conduce a la formación del trombo y la oclusión del vaso"

La LDL-oxidada se define como una "LDL modificada oxidativamente" por productos orgánicos como los aldehídos que transforman a los componentes de las proteínas y aumentan las cargas negativas de las LDL necesarias para su interacción y absorción por los macrófagos; siendo entonces, una partícula derivada de LDL que puede tener peróxidos o sus productos de degradación generados dentro de la molécula (Parthasarathy, 2010).

Esta ha sido considerada el cuarto colesterol, a sumar a los tres más utilizados en la práctica médica: HDL, LDL y colesterol total, siendo considerada un colesterol más

aterogénico (Boronat et al., 2005; Pereira, et al., 2000), dada su estrecha relación con los radicales libres, conociéndose que su aumento tiene valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis que evidencian su relevante papel en la etiología de ésta (Elejalde, 2001);

Algunas investigaciones han encontrado diferentes proteínas independientes pro-aterogénicas asociadas a los componentes lipídicos de la LDL oxidada, como las IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, y IL-12 (Fernández & Patiño, 2007), y moléculas pro-inflamatorias como: el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), el factor de activación y agregación plaquetaria (PAF) todos asociados a las formación de la placa ateromatosa (Dulín, 2010).

En base a las pruebas in vitro, la LDL-oxidada se divide en dos categorías principales: "LDL mínimamente modificada" (LDL-MM) y "LDL ampliamente oxidada" (LDL-Ox). Las diferencias de las dos categorías de LDL se explica en que la LDL-MM se origina en la primera etapa de la oxidación antes de que los monocitos sean reclutados, donde la oxidación de la LDL presenta pocos cambios en la apo-B. La LDL-MM es químicamente diferente de la LDL nativa; sin embargo, todavía es reconocida por los receptores de la LDL nativa, pero no por la mayoría de los receptores *scavenger*. En la segunda etapa los monocitos son reclutados en la lesión y convertidos en macrófagos con la capacidad de fagocitar cuerpos extraños, entre ellos LDL oxidada, por un proceso de endocitosis. En esta etapa, los lípidos de la

LDL se oxidan más, pero la porción de proteína de la LDL también se modifica, lo que lleva a una pérdida de reconocimiento por el receptor de LDL nativa y se produce un cambio de reconocimiento por parte de los receptores *scavenger* hacia la LDL-oxidada (Cirpa, 2013).

Cada una de las dos categorías de la LDL-oxidada se compone de una gran variedad de preparaciones que difieren en composición y efectos biológicos. Debido al tipo de agente oxidante utilizado y las condiciones de oxidación de la LDL se determinará las propiedades químicas y biológicas de la LDL-Ox (Levitan, et al., 2010).

Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica (Cirpa, 2013).

Numerosas investigaciones apoyan los aspectos ya descritos, en su mayoría asociadas a enfermedad cardiovascular; entre ellas, Holvoet et al. (1998) fueron los primeros en demostrar que los pacientes con enfermedad coronaria tenían niveles plasmáticos significativamente elevados de LDL-oxidada, y que estos niveles eran muy similares en pacientes con enfermedad coronaria estable y en pacientes con síndromes coronarios agudos y significativamente mayores en pacientes con angina

estable, angina inestable e infarto agudo de miocardio en comparación con sujetos de control de la misma edad y supuestamente sanos.

Similarmente, en las sesiones científicas de la Asociación Cardiológica Americana de 2002, Johnston et al. (2002) notificaron que, en sus estudios, los niveles plasmáticos de LDL oxidada fueron sustancialmente más altos en pacientes con enfermedad coronaria inestable, comparado con los controles sanos.

Además, Sigurdardottir, Fagerberg & Hulthe. (2002) atribuyen una relación entre las concentraciones plasmáticas de LDL-oxidada y LDL “pequeña y densa” en pacientes con síndrome metabólico y constatan cifras bajas de LDL-oxidada en pacientes sin factores de riesgo.

Por su parte, Hulthe & Fagerberg (2002) demostraron la relación entre la aterosclerosis subclínica y los niveles circulantes de LDL-oxidada al mostrar que los niveles de ésta estaban relacionados con el grosor de la íntima/media y la aparición de placas en las arterias carótida y femoral.

No obstante, la LDL-oxidada no solamente es pro-aterogénica y pro-inflamatoria, también tiene carácter inmunogénico, provocando la generación de autoanticuerpos séricos (anti- LDLox) (Pererira et al., 2000). Estos anticuerpos anti- LDLox se demuestran tanto en individuos sanos como en pacientes con enfermedad cardiovascular (ECV) y su función aún no está clara, generando controversia al

atribuírseles propiedades aterogénicas así como también anti-aterogénicas y han permitido detectarla en circulación a través de inmunoensayos, considerándose un firme indicador del estrés oxidativo *in vivo* y marcador de aterosclerosis (Ruiz et al., 2011).

En este sentido, Biomedica Gruppe (2010a) señala que los auto-anticuerpos contra la forma oxidada de la LDL se pueden emplear como parámetro que refleja la incidencia del proceso de oxidación que tiene lugar *in vivo*, ya que se han detectado niveles elevados de estos auto-anticuerpos en la sangre de pacientes con enfermedades de las arterias coronarias. Algunos estudios han demostrado una correlación entre dichos auto-anticuerpos y la progresión de aterosclerosis de carótida, aunque también, se han observado niveles bajos de éstos durante procesos de septicemia e infarto de miocardio. Esta detección en suero anticuerpos anti-LDL-oxidada en pacientes con enfermedad aterotrombótica, así como linfocitos T reactivos contra las LDL-oxidada, hace que los mismos puedan ser utilizados como marcadores clínicos de estas enfermedades (Delgado, Vásquez & Fernández, 2012).

En otro orden de ideas, se ha demostrado que en respuesta a los estímulos de estrés o injuria celular, como la apoptosis inducida por el estrés oxidativo, toxinas, shock térmico, etanol y daño celular después de una isquemia, las células producen altos niveles de proteínas características de estrés celular o "proteínas de estrés", inicialmente denominadas HSP (por sus siglas en el idioma inglés Heat Shock Proteins) o proteínas de choque térmico (González, 2010; Peña & Quintini, 1999; Qingbo & Georg, 2004).

Las HSP se encuentran en formas, intracelular y extracelular. La expresión intracelular, ha sido relacionada a funciones en el plegamiento, estabilización, transporte, translocación y degradación proteica. Sin embargo, el origen y la función de la expresión extracelular aún debe ser investigado; aunque, se estima que puede provenir de la liberación del contenido celular durante la necrosis y que debido a su detección en individuos normales, también pudiera estar vinculada a funciones regulatorias (Rada et al., 2011).

La HSP 60 es una de las más conocidas de estas proteínas de choque térmico, cuya expresión se incrementa cuando las células están sometidas a diversos tipos de estrés (Rada et al., 2011).

Es conocido que la célula efectúa la producción de estas proteínas con la finalidad de protegerse de las condiciones desfavorables, como un mecanismo de defensa, inmediatamente después de un aumento repentino de la temperatura del medio ambiente, actuando como buffer para amortiguar el daño que este aumento de temperatura pueda causarle. Este hecho puede ser observado tanto en las bacterias de estructura más simple como en las neuronas más diferenciadas (Quintini, 2008).

De modo que, estas proteínas aparecen involucradas en la tolerancia y la citoprotección y su participación ha sido investigada en relación con la patogénesis, la prognosis y el tratamiento de diversas patologías; a pesar de lo que los mecanismos

asociados no han sido determinados adecuadamente. No obstante, la inducción de la síntesis de éstas ha sido relacionada con la defensa del organismo frente a infecciones diversas. Así, la familia Hsp60 ha sido vinculada con mecanismos involucrados en la defensa molecular del hospedador frente a infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, entre otras (Rada et al., 2011).

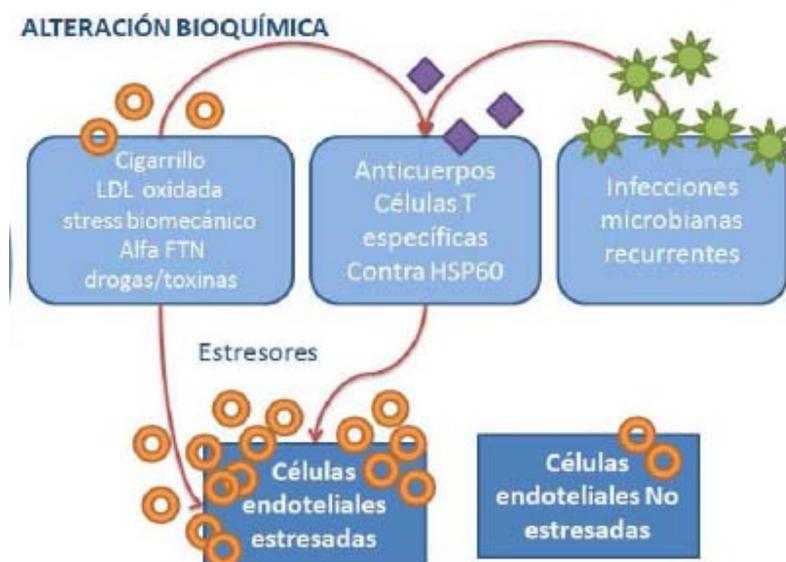
Por otra parte, las HSP extracelulares pueden estimular el sistema inmune, particularmente influenciando la respuesta inflamatoria, induciendo la producción de citoquinas y mediando en la presentación de antígenos (Rada et al., 2011). De allí que, dichas proteínas, se encuentran inmersas en la hipótesis inmunológica de la aterosclerosis la cual tiene sus bases en los eventos de la respuesta inmunológica que tienen lugar ante los diferentes estímulos aterogénicos, dado que en las lesiones ateroscleróticas se han observado complejos de anticuerpos, antígenos y proteínas del sistema del complemento en el espacio sub-endotelial, observándose linfocitos B en los bordes de las lesiones. También se ha comprobado que las etapas más tempranas de la aterosclerosis se caracterizan por una reacción probablemente causada por auto-antígenos y es posible identificar linfocitos T presentes en la lesión, incluso, antes que se produzca el desarrollo de la placa (Delgado, Vásquez & Fernández, 2012).

En este sentido, las HSP (junto con la LDL-oxidada) son consideradas auto-antígenos primarios en el proceso de aterosclerosis; y dado que participan en el

recambio, reparación y aclaramiento de proteínas que han sido dañadas o inactivadas, se sintetizan en altas concentraciones cerca de regiones donde se produzca estrés celular, como en el endotelio vascular y los procesos inflamatorios; existiendo en la literatura evidencias del carácter inmunogénico de las HSP, ya que, su efecto protector celular termina siendo revertido en un proceso totalmente contrario; pues su presencia en la superficie celular de HSP60 constituye una señal para que el sistema inmunitario las reconozca, se active y la célula sea destruida. Además, se ha observado que existe una interrelación entre las LDL-oxidada y las HSP, puesto que las primeras pueden, por sí mismas, desencadenar un aumento de la expresión de HSP por parte de las células endoteliales (Delgado, Vásquez & Fernández, 2012).

De manera que, lo establecido por Knoflach, Bernard & Wick (2005), puede ser resumido en que los anticuerpos y las células T que son formados en contra de la proteína de “heat-shock” (HsP60) por infecciones recurrentes, pueden hacer reacción cruzada con la HsP60 humana expresada en las células endoteliales estresadas, pero no en las células no estresadas (Figura N° 3). Considerando dentro de los estresores el estrés biomecánico (hipertensión arterial, estrés turbulento en los puntos de bifurcación del vaso), citoquinas (tales como el factor tumoral de necrosis [FTN-alfa] o la LDL oxidada. Algunos de estos factores pueden alterar químicamente la HsP60 humana para hacerla inmunogénica e inducir una reacción autoinmune (Peña, 2009).

Figura N° 3. Resumen de la hipótesis inmunológica de la aterosclerosis



Tomado de: Peña, J. (2009). Enfoque integral de la enfermedad coronaria en el hombre. Con especial referencia a los anticuerpos circulantes de la proteína de estrés Anti-Hsp60. [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

Sobre esta base, Quintini (2008) y Peña (2009) realizaron investigaciones relacionando las necesidades existenciales y los eventos vitales con la concentración de anticuerpos circulantes contra la HSP60 en una población con cardiopatía isquémica, mostrando en este tipo de pacientes lo anteriormente referido.

Sistema de Hipótesis.

HIPÓTESIS GENERALES

- ⊙ Es posible que en la muestra objeto de estudio, los individuos que han padecido ACV isquémico presenten niveles de los componentes del índice global de estrés (estrés psicosocial e índice de reactividad al estrés) y de los marcadores bioquímicos LDL- oxidada y anti-HSP60, mayores que los individuos sanos.
- ⊙ Es posible que en el grupo en estudio, los componentes del índice global de estrés (estrés psicosocial e índice de reactividad al estrés) y los marcadores bioquímicos LDL-oxidada y anti-HSP60 constituyan factores de riesgo a ACV isquémico.

HIPÓTESIS CAUSAL

- ⊙ Es posible que en la población objeto de estudio exista una relación directa y concordante entre los componentes del índice global de estrés (estrés psicosocial y reactividad al estrés) y los marcadores bioquímicos LDL-oxidada

y anticuerpos contra la proteína de estrés (anti-HSP60), que sugiera que estos tienen una relación fisiopatogénica con el ACV isquémico y, por tanto, ser considerados como factores de riesgo al mismo.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

- ⊙ Comparar los niveles de estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés y concentraciones de los marcadores bioquímicos LDL-oxidada y anticuerpos anti-HSP60 entre el grupo de pacientes con ACV isquémico y su grupo control.
- ⊙ Proponer a los componentes del índice global de estrés y a los ya mencionados marcadores bioquímicos LDL-oxidada y los anticuerpos anti-HSP60 como marcadores no tradicionales de riesgo a enfermedad cerebrovascular isquémica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⊙ Determinar los niveles de estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés, LDL-oxidada y anti-HSP60 en pacientes con ACV isquémico e individuos controles.

- ⊙ Comparar estadísticamente los niveles promedio de los ya referidos parámetros psicológicos y bioquímicos entre pacientes con ACV isquémico versus sus respectivos controles.

- ⊙ Correlacionar los niveles de los componentes del índice global de estrés (estrés psicosocial e índice de reactividad al estrés) y los marcadores bioquímicos LDL- oxidada y anticuerpos anti-HSP60 en el grupo de estudio.

- ⊙ Establecer niveles de estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés, LDL- oxidada y anti-HSP60 con probabilidad de riesgo a ACV isquémico.

CAPÍTULO II
MARCO METODOLÓGICO

TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Se desarrolló una investigación empírica, de campo, de corte transversal, con enfoque cuantitativo, de acuerdo a la clasificación de Velasco (2009).

METODOLOGÍA GENERAL.

Antes de proceder a aplicar las técnicas e instrumentos aquí utilizados, se obtuvo permiso de la Comisión de Ética del Hospital Tulio Carnevali Salvatierra del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales para la revisión de las historias médicas de pacientes con diagnóstico de egreso de ACV isquémico, así como para ser ubicados para su participación en este trabajo y la extracción de muestras sanguíneas. Así, se sometieron al estudio 64 individuos, dispuestos a participar en el mismo, según consentimiento informado, divididos en dos grupos poblacionales: ACV y control. Cada individuo fue visitado en su domicilio; en el caso del grupo ACV luego de 1 a 6 meses después del accidente cerebrovascular y fue escuchado en el relato del transcurso de su enfermedad y todos los aspectos que el mismo considerara necesario aportar durante la entrevista; y en el caso de los del grupo control, según su posibilidad. A todos ellos, les fue aplicado el cuestionario del Índice de Reactividad al Estrés de González de Rivera y de la Escala de Estrés psicosocial de Holmes y Rahe (www.uam.es/departamentos/medicina/psiquiatria/comunicologia/Holmesyrahe.doc).

Igualmente, a cada individuo se le extrajo un espécimen de sangre en condiciones de ayuno, la cual se utilizó para determinar los niveles séricos basales de glicemia y perfil lipídico, que en el caso de los controles se empleó para determinar si cumplían con los criterios de inclusión, para lo cual también se les midió la tensión arterial, peso, medida del perímetro de la cintura a la altura del ombligo. Dicha muestra se empleó, también, para determinar la concentración de LDL-oxidada y anticuerpos antiHSP60. Con los resultados obtenidos se realizaron los análisis estadísticos necesarios para el cumplimiento de los objetivos planteados.

Ila- Población, muestra y criterios de inclusión:

Población:

Para el presente estudio se contemplaron dos poblaciones, la primera constituida por 74 pacientes con diagnóstico de ACV que acudieron a la Emergencia y fueron atendidos en las Unidades de Medicina Interna y Neurología del Hospital Tipo II Dr. Tulio Carnevali Salvatierra, del Instituto Venezolano de Los Seguros Sociales (IVSS) y la segunda conformada por individuos aparentemente sanos del municipio Libertador del estado Mérida, en período noviembre 2009 – octubre 2014.

Muestra

El tipo de muestreo empleado fue el consecutivo, no probabilístico, dado que se trató de incluir a todos los pacientes ACV que cumpliendo con los criterios de inclusión

quisieran participar en la investigación. De modo que, la muestra estuvo conformada por 32 individuos que, una vez consultados al respecto y explicarles las implicaciones del mismo, aceptaron participar en el estudio y a cuyos efectos se denominó grupo ACV. El mismo estuvo constituido por 16 mujeres entre 30 y 86 años de edad y 16 hombres, entre 36 y 73 años de edad; ellos habían sido recluidos en el referido hospital del IVSS de la ciudad de Mérida, con diagnóstico de egreso de ACV isquémico, sucedido entre uno a seis meses previos al estudio, diagnosticado clínicamente, así como por Tomografía Axial Computarizada y/o Resonancia Magnética Nuclear, de acuerdo a los datos obtenidos de su historia clínica; sin enfermedad psiquiátrica ni secuelas que impidieran su capacidad para responder a los test a aplicar, los otros 4 fueron individuos voluntarios residentes de la ciudad de Mérida diagnosticados de igual manera a la ya descrita, pero atendidos en otros centros hospitalarios en el año 2012.

A su vez, se contó con un grupo control constituido por 32 voluntarios aparentemente sanos, 16 mujeres entre 29 y 86 años de edad y 16 hombres entre 37 y 75 años de edad. Los mismos correspondieron a personal de distintas dependencias de la Universidad de Los Andes, así como familiares y/o amigos de estos; seleccionados por muestreo consecutivo, no probabilístico e intencional, de manera tal que estuvieran pareados a un correspondiente individuo del grupo ACV, según su edad (con una diferencia no mayor a ± 5 años) y sexo. Una vez que les fue explicada las implicaciones del estudio y aceptaron su participación, fueron incluidos todos aquellos sin enfermedad vascular periférica, cardiovascular o cerebrovascular,

sin hiperlipidemias, ni hipertensión arterial, diabetes mellitus, síndrome metabólico, cardiopatías, tabaquismo, obesidad, drogadicción o alguna enfermedad crónica o psiquiátrica, con niveles basales de glicemia y perfil lipídico dentro del rango de referencia. Estos fueron visitados entre 2010 y 2014.

Todos los individuos de ambos grupos dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio y someterse a las pruebas aquí descritas, para ello se les dio a conocer de manera explícita las implicaciones del mismo, tanto de forma verbal como escrita, utilizando para ello un consentimiento informado (Anexo 1), el cual fue firmado por cada uno de ellos, y algún familiar allí presente, durante la visita, en señal de conocimiento y aprobación del mismo.

IIb- Técnicas y recolección de datos

Instrumento de recolección de datos

Mediante autorización expedida por el Hospital Tipo II Dr. Tulio Carnevali Salvatierra del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales de Mérida-Venezuela, en el Departamento de Registro y Estadísticas de Salud se revisaron las historias médicas de los pacientes que habían sido atendidos en dicho centro con diagnóstico de egreso de ACV isquémico. De esta forma, se completó un instrumento de recolección de datos de elaboración propia (Anexo 2) para cada uno de los individuos, con la finalidad de obtener los datos personales, para su posterior ubicación; así como otros

datos de índole clínico, con la finalidad de seleccionar aquellos que cumplieran con los criterios para su inclusión en el estudio, descritos anteriormente.

Una vez contactado cada individuo y aceptado su participación en el estudio, se completó el instrumento en la visita que posteriormente fue efectuada una vez transcurrido mínimo un mes, máximo 6 meses después de haber padecido el ACV isquémico o simplemente a su conveniencia en el caso del grupo control.

Determinación del Índice de Reactividad al Estrés (IRE):

Al ser visitado, cada uno de los individuos fue interrogado sobre los diferentes aspectos que contempla el test de estrés de González de Rivera (Anexo 3) y sus respuestas fueron utilizadas para determinar su índice de reactividad al estrés (IRE) al ser procesadas en la página web del Instituto de Psicoterapia Autógena y Centro de Investigación Psicosomática (www.psicoter.es/tests/test-de-estres), mediante lo cual fue obtenido el índice de cada individuo. Dichos índices han sido catalogados de la siguiente manera: menores de 0,6 se consideran bajos; entre 0,6 y 1, medio-alto y puntuaciones mayores de 1 demasiado altos (González, 2006)

Cuestionario sobre eventos vitales de Holmes y Rahe:

A su vez, cada individuo fue interrogado sobre cada uno de los acontecimientos señalados en la escala de estrés psicosocial de Holmes y Rahe de eventos vitales

(<http://pacotraver.files.wordpress.com/2008/11/holmesyrahe.doc>) (Anexo 4), ocurridos durante los seis meses a un año previos al estudio (Control) o al ACV (Grupo ACV), a fin de determinar el nivel de estrés psicosocial, empleando la suma de la puntuación contemplada por la referida escala para cada evento; obteniéndose, así, las unidades de cambio vital (LCU, por sus siglas en idioma inglés) (González, 2010). En este caso, se consideró que un puntaje de LCU menores a 150 con riesgo leve de enfermedad, LCU entre 150 a 299 con riesgo moderado y más de 300 LCU como riesgo elevado, (http://en.wikipedia.org/wiki/Holmes_and_Rahe_stress_scale)

Obtención de especímenes

Especimen de sangre: Tras un ayuno de 12 horas, a cada participante se le extrajo entre 5 y 10 cc de sangre, de una vena del antebrazo, después de ser mantenido en reposo al menos unos 15 minutos.

Dicho espécimen fue trasvasado a un tubo de ensayo limpio, sin anticoagulante y en éste fue trasladado al laboratorio de Bioquímica Clínica de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, donde se separó el suero mediante centrifugación, posterior a la coagulación de dicho espécimen, de acuerdo a las recomendaciones para la obtención de muestras de calidad analítica para tal procedimiento (Morán, 2004).

Esta muestra de suero fue distribuida en 3-5 alícuotas de 0,5 mL cada una en viales Eppendorf de plástico de 1,5 mL y se preservaron a -24°C hasta el momento de la realización de los ensayos correspondientes.

Determinaciones de laboratorio:

Con la finalidad de verificar los criterios de inclusión en cuanto a niveles de parámetros bioquímicos, a cada individuo de los integrantes de los grupos ACV y control se les realizó la determinación de los niveles basales de glicemia y perfil lipídico, tal como se describe a continuación:

Glicemia y Perfil lipídico: En las muestras de suero una vez obtenidas, o conservadas a -24°C, se realizaron las determinaciones de glucosa y del perfil lipídico: triglicéridos, colesterol total y fracciones.

Las determinaciones glucosa, triglicéridos y colesterol total se efectuaron utilizando métodos enzimáticos; mientras que las fracciones HDL del colesterol fueron determinadas mediante método monofase y las LDL por este método o se estimó mediante la fórmula de Friedewald, dependiendo de los niveles resultantes de triglicéridos (Parra y Jonguitud, 2007).

Las determinaciones de los primeros 34 individuos fueron realizadas de forma manual en el laboratorio de Bioquímica Clínica de la Escuela de Bioanálisis de la

Universidad de Los Andes; utilizando reactivos Wiener (Anexos 5, 6, 7, 8 y 9), un dispensador-dilutor automático Gilford para el dispensado de muestras, calibradores, sueros controles y reactivos; y un espectrofotómetro Gilford Stasar IV para las lecturas de las concentraciones; verificando la confiabilidad de las determinaciones con el procesamiento simultáneo de sueros controles Randox en niveles dentro y superior al rango de referencia de cada analito.

Las otras 30 mediciones se efectuaron de forma automatizada en el Laboratorio del Hospital Sor Juana Ines de La Cruz de la ciudad de Mérida; utilizando un autoanalizador Dimension Xpand de Dade Behring y reactivos, calibradores y sueros controles de esta misma marca (Anexos 10, 11, 12 y 13). Estos últimos en niveles normales y elevados para cada parámetro, procesados de forma simultánea fin de verificar la confiabilidad de cada análisis.

De igual manera, a los individuos que cumplieron con los criterios de inclusión, se les efectuó la determinación de los niveles basales de LDL oxidada y anticuerpos anti HSP60, tal como se describe a continuación:

LDL-oxidada: Con otras alícuotas de las muestras preservadas a -24°C se realizaron las determinaciones de LDL-oxidada en el Laboratorio de Hormonas del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) de la ciudad de Mérida, mediante el método de ELISA, empleando reactivos de Biomédica Gruppe (Anexo 14) (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien,

Divischgasse, 2010b), utilizando pipeta multicanal Brand Transferpette-8 de 10 a 100 uL para el dispensado de reactivos, incubador SI 18 Stuart Scientific para la incubación a 37°C, un lavador automático BIOELISA WAFHER Biokit EL 50 para los lavados correspondientes y un lector de ELISA TECAN Sunrise para la obtención de las absorbancias resultantes.

Cada determinación fue realizada por duplicado y para evaluar la confiabilidad de la determinación fue procesado por triplicado un suero control valorado, provisto con el kit de reactivos ya descrito.

Para el cálculo de las concentraciones se utilizó una curva de calibración elaborada con las absorbancias resultantes de la determinación por duplicado en los diversos calibradores provistos con el kit de reactivos de Biomedica Gruppe.

Anticuerpos anti-HSP60: Con alícuotas similares a las anteriores se realizaron las determinaciones por duplicado de anticuerpos anti HSP60 en el Laboratorio de Hormonas del IAHULA mediante el método de ELISA, empleando reactivos de Stressgen Biotechnologies (Anexo 15) (Stressgen Biotechnologies Corp., 2008).

Para ello se utilizó una pipeta multicanal Brand Transferpette-8 de 10 a 100 uL para el dispensado de reactivos, un rotador automático Arthur Thomas Co. para los períodos de incubación a temperatura ambiente, un lavador automático BIOELISA WAFHER Biokit EL 50 para los lavados correspondientes y un lector de ELISA

TECAN Sunrise para la medición de las absorbancias resultantes. Procesando, simultáneamente y por duplicado, los calibradores provistos con el kit de reactivos y un material de control preparado para evaluar la confiabilidad del ensayo. Se utilizaron las absorbancias resultantes de la determinación en los diversos calibradores para elaborar la gráfica necesaria para obtener las concentraciones correspondientes a cada paciente, tal como indica el fabricante.

II c) Pruebas estadísticas

Se utilizó el software IBM SPSS versión 21 para el diseño de la base de datos y procesamiento de los análisis mediante estadística descriptiva e inferencial.

Dependiendo de la naturaleza de las variables, se empleó el estadístico t para muestras independientes para la comparación de medias; chi-cuadrado para comparar la severidad y la incidencia de la enfermedad; correlación de Pearson para medir la relación lineal entre variables; Odds Ratio para determinar factores de riesgo y análisis de correspondencia múltiple para caracterizar los puntos de corte de los factores de riesgo. La significancia estadística se estableció si $P < 0,05$.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

RESULTADOS

Tabla N° 1.
Matriz de datos por variable para pacientes con ACV y sus respectivos controles.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Periodo noviembre 2009 – octubre 2014

Código	SEXO	Edad (años)		IRE vegetativo		IRE emocional		IRE cognitivo		IRE conductual		IRE total		Holmes y Rahe (LCU)		LDL-Oxidada (ng/mL)		Anti-HSP60 (ng/mL)	
		ACV	C	ACV	C	ACV	C	ACV	C	ACV	C	ACV	C	ACV	C	ACV	C	ACV	C
2	F	82	84	0,40	0,80	0,60	1,00	0,60	0,60	0,86	1,14	0,58	0,89	196	82	12500	3800	63502	14595
4	F	84	83	1,47	0,20	2,00	0,00	1,00	0,40	1,71	0,43	1,53	0,25	500	241	10750	3250	44695	23457
6	F	74	73	1,80	1,40	2,00	1,60	3,20	1,40	1,29	1,29	1,94	1,42	553	28	7000	3900	41342	22690
8	F	47	46	1,27	0,73	2,20	0,40	1,80	1,00	1,43	0,43	1,67	0,66	423	158	4000	13500	26945	21965
10	F	81	80	0,60	1,80	1,40	1,60	1,20	1,00	0,86	1,43	0,88	1,56	62	153	18500	3900	32659	17197
12	F	49	48	2,27	0,40	2,40	0,80	0,80	0,60	2,43	1,00	2,09	0,65	481	71	18250	8500	21676	12009
14	F	60	62	1,33	0,47	0,80	1,00	1,40	1,00	2,29	1,00	1,47	0,75	141	88	11000	8950	54768	27168
16	F	30	29	1,20	0,67	1,20	1,00	1,40	0,80	1,00	1,29	1,19	0,88	0	171	9600	10150	34249	33860
18	F	82	80	0,67	0,33	0,60	0,40	1,40	0,60	0,57	0,14	0,75	0,37	431	217	16800	4500	126590	15950
20	F	67	65	0,73	0,30	1,40	0,80	1,00	1,40	1,43	1,00	1,03	0,72	332	96	8600	13000	23844	17197
22	F	76	77	1,67	0,20	2,60	0,20	0,60	0,20	2,43	0,43	1,81	0,25	480	59	7900	6000	53700	31604
24	F	86	86	0,80	0,73	1,20	0,40	0,60	1,60	1,71	0,43	1,07	0,75	193	159	4500	10000	41422	16040
26	F	45	44	1,18	0,65	1,60	0,72	1,25	0,85	1,51	0,85	1,35	0,74	284	122	13250	5500	97109	17589
28	F	65	65	1,47	0,40	2,00	0,80	1,00	0,60	1,71	1,00	1,53	0,65	316	80	9200	2200	35980	16260
30	F	67	67	1,27	0,20	2,20	0,20	1,80	0,20	1,43	0,43	1,67	0,25	369	140	18200	3800	34249	23200
32	F	80	80	0,73	0,47	1,40	0,20	1,00	0,40	1,43	1,00	1,03	0,52	295	91	14100	3510	41342	13200
1	M	73	75	0,20	0,33	0,20	0,60	1,00	0,00	0,43	0,43	0,46	0,34	467	224	5950	7350	44075	27109
3	M	36	37	0,87	0,80	1,80	0,60	0,60	0,60	1,71	0,43	1,25	0,66	382	160	6300	3950	23129	15896
5	M	73	73	0,13	0,07	1,20	0,20	0,40	0,00	0,71	0,14	0,61	0,10	115	38	6250	4950	23457	16621
7	M	42	45	0,46	0,07	1,00	0,40	0,80	0,80	1,43	1,14	0,92	0,60	661	23	8400	3100	26805	22567
9	M	58	56	1,93	0,27	1,80	0,60	1,60	0,40	3,14	0,29	2,12	0,39	305	170	8300	4250	20180	21387
11	M	73	74	0,93	0,52	1,80	0,40	1,40	0,00	1,29	0,29	1,22	0,22	401	20	11500	5500	95890	34682
13	M	60	59	2,33	0,27	1,00	0,20	2,00	0,40	2,29	0,57	2,06	0,34	511	113	7600	11000	33860	30636
15	M	57	54	0,00	0,27	0,80	0,60	3,60	0,40	1,14	0,29	0,94	0,39	443	171	7550	4000	56954	31604
17	M	65	64	1,27	0,60	2,20	0,40	1,40	1,20	1,43	0,29	1,47	0,59	311	245	8500	3250	21676	14595
19	M	69	66	1,07	0,53	2,00	0,60	1,00	0,40	1,57	0,57	1,31	0,53	639	103	17800	6250	34249	31792
21	M	40	38	0,93	0,13	1,80	0,20	1,40	1,20	1,29	0,57	1,22	0,41	506	115	13040	4000	97129	24566
23	M	57	57	0,00	0,13	0,80	0,20	3,60	0,20	1,14	0,29	0,94	0,20	600	28	12040	7750	65500	44219
25	M	71	69	1,07	0,80	2,00	0,80	1,00	0,60	1,57	1,14	1,31	0,84	325	148	11250	5800	93360	13006
27	M	58	58	2,33	0,53	1,00	0,80	2,00	0,80	2,29	1,14	2,06	0,81	406	176	17000	4900	22690	15029
29	M	44	44	0,87	0,60	1,80	1,00	0,60	1,00	1,71	0,71	1,25	0,82	281	157	9250	6980	45087	19942
31	M	72	70	0,46	0,67	1,00	0,60	0,80	1,20	1,43	1,00	0,92	0,81	423	135	10750	10800	44364	28139

Fuente: elaboración propia.

Se muestran todos los resultados obtenidos en el estudio. Para cada aspecto se presentan los datos por parejas de pacientes (ACV) y control (C), correspondiendo los números pares a mujeres y los impares a hombres

Al aplicar la metodología descrita anteriormente, se encontraron los resultados que se presentan en tablas y gráficos a continuación, según los análisis efectuados.

1. Comparación del estrés psicosocial

Los resultados de la comparación del estrés psicosocial, determinado mediante la escala de Holmes y Rahe, se resumen en las tablas N° 2 y N° 3, y el Gráfico N° 1.

Tabla N° 2.
Comparación del estrés psicosocial según grupo.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

Grupo	Escala de Holmes y Rahe	P
	Media (DE) LCU	
ACV	369,75 (160,18)	0,000*
Control	124,44 (63,28)	

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas

Nota: DE= desviación estándar LCU= Unidades de Cambio Vital

El promedio de las LCU para los pacientes con ACV fue significativamente superior P(0,000) al del grupo control.

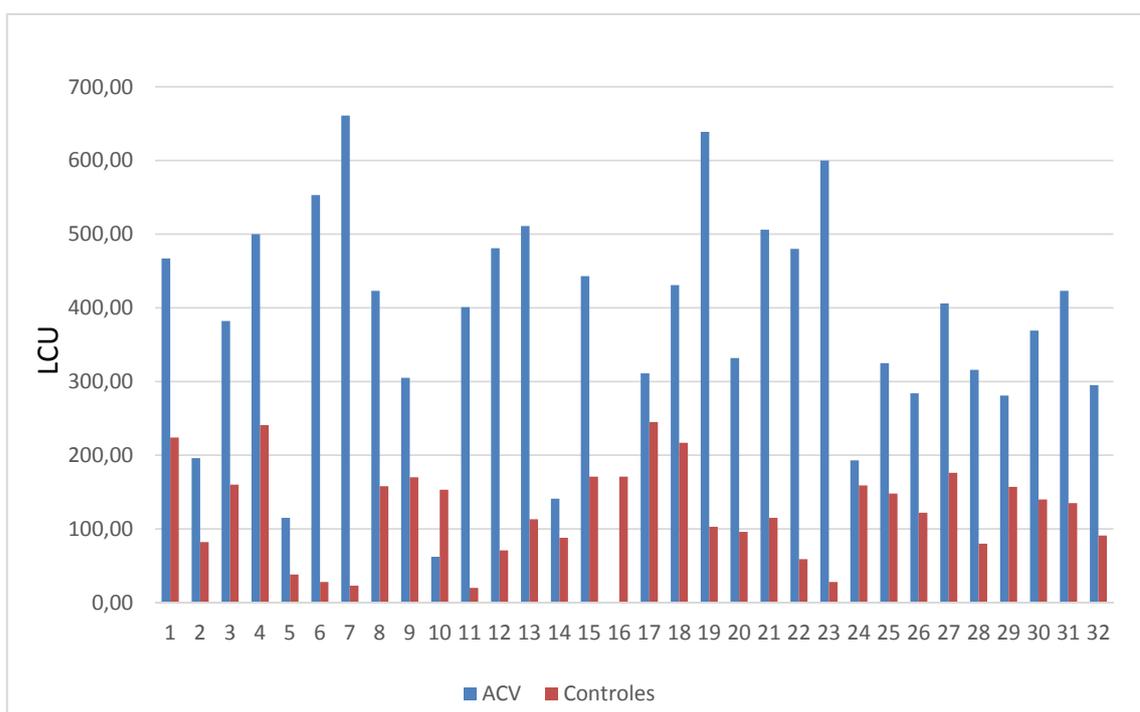
Tabla N° 3.
Comparación del nivel de estrés psicosocial por grupo.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

Nivel de estrés Psicosocial (LCU)	Grupo		P
	ACV	Control	
	Total (%)	Total (%)	
Bajo (< 150)	4 (12,50%)	19 (59,38%)	0,000*
Moderado (150 - 299)	5 (15,62%)	13 (40,62%)	
Alto (≥ 300)	23 (71,88%)	0 (0,00%)	

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas

El 71,88% de los pacientes con ACV presentó índices altos de estrés psicosocial, mientras que en los controles el mayor porcentaje (59,38%) mostró niveles bajos.

Gráfico N° 1
Niveles individuales de estrés psicosocial en pacientes con ACV y sus respectivos controles.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014



Fuente: elaboración propia

LCU: Unidades de cambio vital

Se muestran las 32 parejas de individuos; donde el 93,75% (30 de los 32) de los pacientes del grupo de ACV presentó mayor nivel de estrés psicosocial (en ULC) que su respectivo individuo control.

2. Comparación del índice de reactividad al estrés

En las Tablas N° 4 y N°5, y el Gráfico N° 2 se presentan los resultados obtenidos al efectuar la comparación de cada uno de los componentes del Índice de Reactividad al Estrés (IRE) entre los pacientes con ACV isquémico y el grupo de control.

Tabla N° 4.
Comparación del puntaje del índice de reactividad al estrés por grupo.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela.
Período noviembre 2009 – octubre 2014

Índice de reactividad al estrés	Grupo		P
	ACV	Control	
	Media (DE)	Media (DE)	
IRE total	1,30 (0,45)	0,61 (0,33)	0,000*
Vegetativo	1,05 (0,64)	0,51 (0,37)	0,000*
Emocional	1,49 (0,60)	0,60 (0,38)	0,000*
Cognitivo	1,35 (0,81)	0,68 (0,43)	0,000*
Conductual	1,52 (0,59)	0,71 (0,38)	0,000*

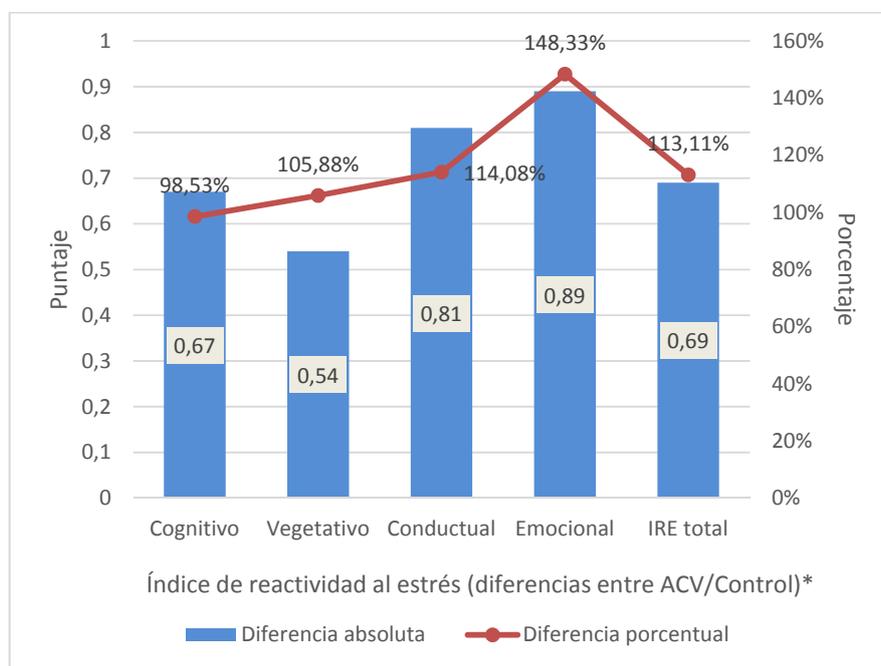
Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas

Nota: DE= desviación estándar

Se puede observar que, para cada comparación, los puntajes promedios de los pacientes con ACV fueron superiores a los del grupo control, con significación estadística $P(0,000)$.

Gráfico N° 2.

Diferencias absolutas y porcentuales del índice de reactividad al estrés entre grupos ACV y control. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014



Fuente: Cálculos propios; *diferencias significativas $P<0,05$

Para el IRE total y cada uno de sus componentes la diferencia entre pacientes (ACV) y controles fue superior al 100%, salvo el IRE cognitivo que alcanza un porcentaje de 98,53%.

Tabla N° 5.

**Comparación del nivel de reactividad al estrés por grupo.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014**

Nivel de reactividad al estrés		Grupo		P
		ACV	Control	
		Total (%)	Total (%)	
IRE total	Bajos	2 (6,25%)	15 (46,88%)	0,000*
	Medio altos	7 (21,88%)	15 (46,88%)	
	Demasiado altos	23 (71,88%)	2 (6,25%)	
Vegetativo	Bajos	7 (21,88%)	20 (62,50%)	0,000*
	Medio altos	9 (28,13%)	10 (31,25%)	
	Demasiado altos	16 (50,00%)	2 (6,25%)	
Emocional	Bajos	1 (3,13%)	14 (43,75%)	0,000*
	Medio altos	9 (28,13%)	16 (50,00%)	
	Demasiado altos	22 (68,74%)	2 (6,25%)	
Cognitivo	Bajos	1 (3,13%)	12 (37,50%)	0,001*
	Medio altos	15 (46,88%)	14 (43,75%)	
	Demasiado altos	16 (50,00%)	6 (18,75%)	
Conductual	Bajos	2 (6,25%)	17 (53,12%)	0,000*
	Medio altos	4 (12,50%)	8 (25,00%)	
	Demasiado altos	26 (81,25%)	7 (21,88%)	

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas

La mayoría de los pacientes con ACV presenta niveles demasiado altos de IRE tanto total como en cada uno de sus componentes, mientras que en el grupo control la mayoría presenta niveles bajos o medio-altos de los mismos.

3. Comparación de los marcadores bioquímicos.

La comparación de los marcadores bioquímicos LDL oxidada y anticuerpos anti-HSP60, entre el grupo con ACV y el grupo de pacientes, se muestra en la Tabla N°6 y los Gráficos N° 3, N° 4 y N° 5.

Tabla N° 6.
Comparación de los marcadores bioquímicos por grupo.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

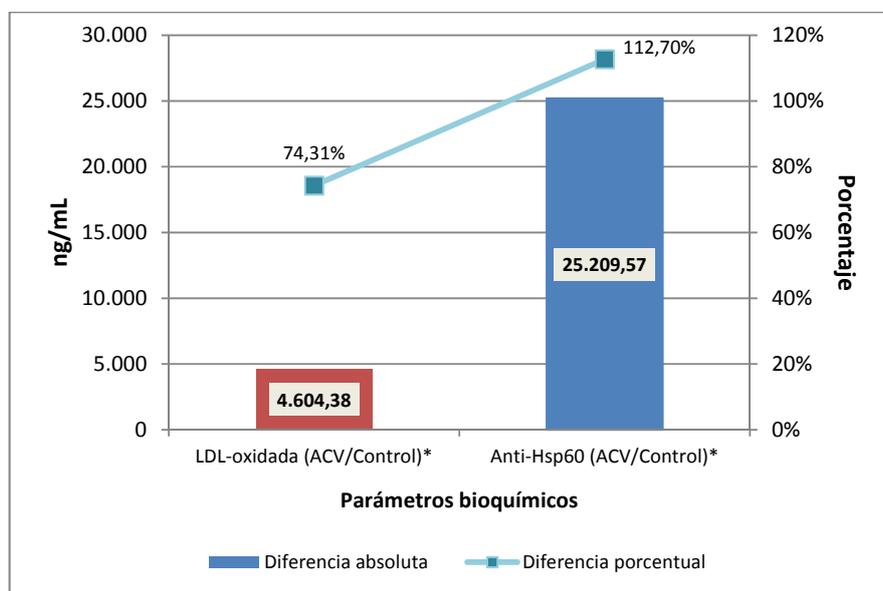
MARCADOR BIOQUÍMICO	Grupo		P
	ACV	Control	
	Media (DE)	Media (DE)	
LDL-oxidada ng/mL	10.800,94 (4.183,95)	6.196,56 (3.054,24)	0,000*
Anti-Hsp60 ng/mL	47.577,41 (27.165,25)	22.367,84 (7.839,34)	0,000*

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas

Nota: DE= desviación estándar

Para el LDL-oxidada y el anti-Hsp60 se observó diferencias en los valores promedios de estos parámetros en los grupos ACV y control con $P(0,000)$; siendo los promedios más elevado en el grupo de pacientes con ACV que en el grupo control.

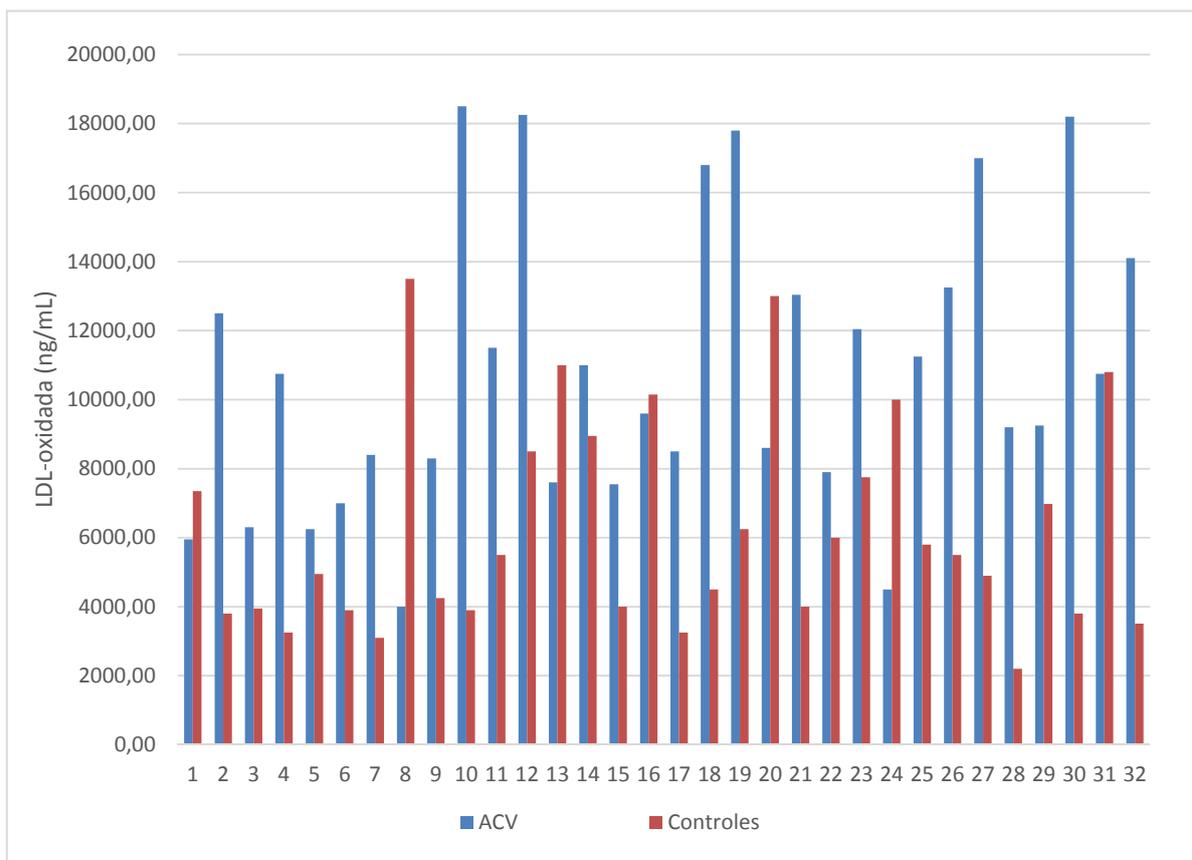
Gráfico N° 3.
Diferencias absolutas y porcentuales de los parámetros bioquímicos entre grupos ACV y control.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014



Fuente: Cálculos propios; *diferencias significativas $P<0,05$

En base a los valores promedios, la diferencia de los pacientes con ACV con respecto al grupo control, para el anti-Hsp60 fue 112,70% y de 74,31% para el LDL-oxidada.

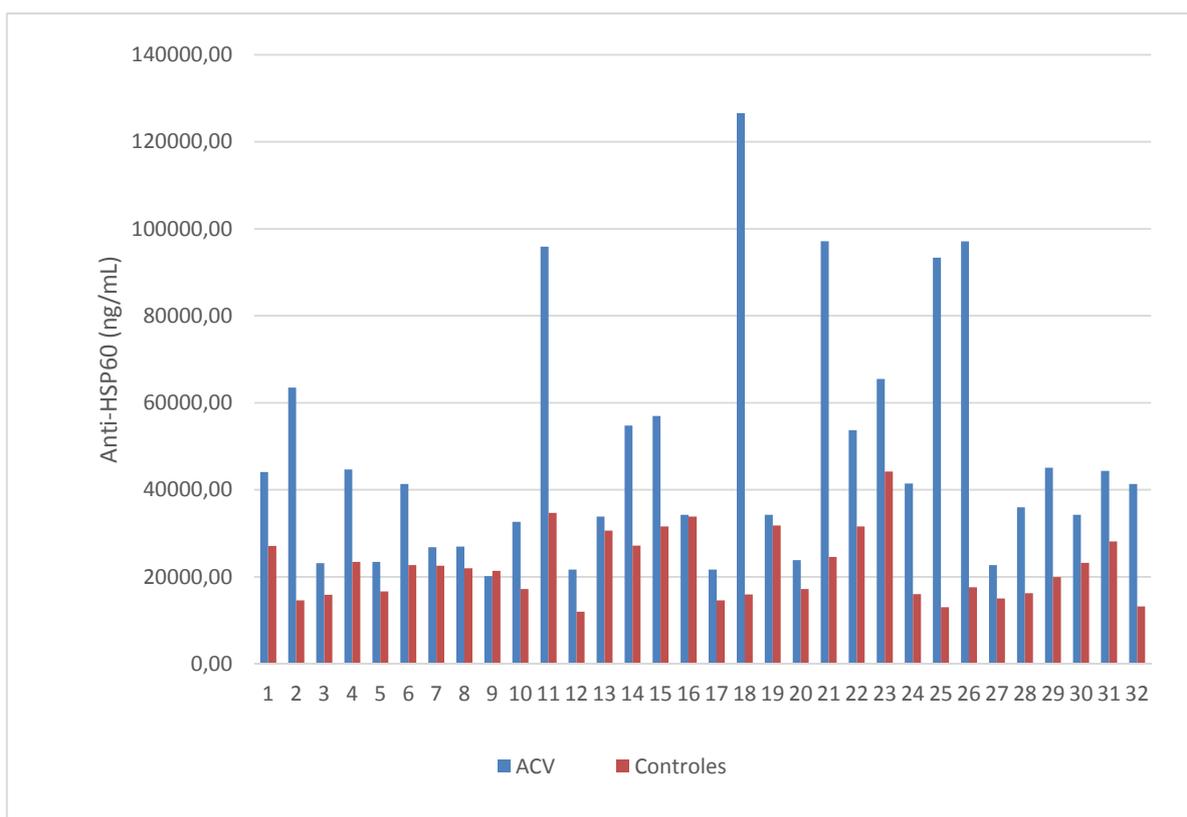
Gráfico N° 4
Niveles individuales de LDL-oxidada en pacientes con ACV y sus respectivos
controles.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014



Fuente: elaboración propia Se muestran las 32 parejas de individuos: paciente y su respectivo control

25 de los 32 (78,13%) pacientes con ACV mostraron mayor concentración de LDL-oxidada que sus respectivos controles.

Gráfico N° 5
Niveles individuales de anti-HSP60 en pacientes con ACV y sus respectivos controles.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014



Fuente: elaboración propia Se muestran las 32 parejas de individuos: paciente y su respectivo control

31 de los 32 (96,88%) de los individuos del grupo con ACV isquémico presentaron mayor concentración de anticuerpos anti-HSP60 que su respectivo control.

4. Correlación entre marcadores bioquímicos y psicológicos

Al considerar todos los individuos bajo estudio, es decir grupos ACV y controles en conjunto para correlacionar cada una de las variables, se encontraron los resultados que se muestran en la Tabla N° 7 y Gráfico N° 4.

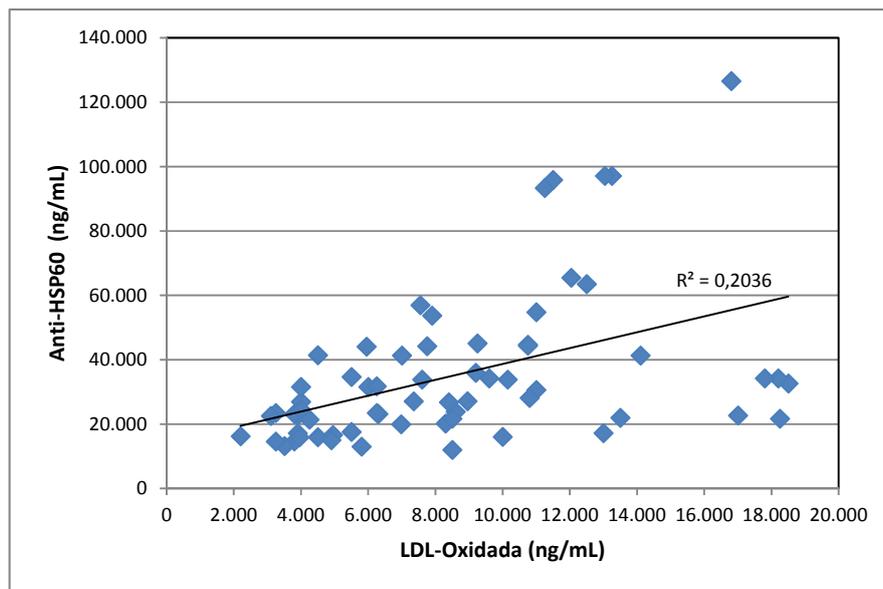
Tabla N° 7.
Correlación entre marcadores bioquímico, estrés psicosocial e IRE. Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

Estrés psicosocial e IRE	Marcadores bioquímicos	
	LDL-Oxidada	Anti-HSP60
Estrés Psicosocial (LCU)	r (0,40) P(0,001)*	r (0,42) P(0,001)*
IRE-total	r(0,40) P(0,001)*	**
IRE-vegetativo	r(0,33) P(0,008)*	**
IRE-emocional	r(0,39) P(0,002)*	r(0,25) P(0,048)*
IRE-cognitivo	r (0,31) P(0,012)*	r(0,28) P(0,023)*
IRE-conductual	r(0,35) P(0,005)*	**

Fuente: Cálculos propios; * Correlación significativa $P < 0,05$, ** no significativa

La LDL-Oxidada presentó relación lineal directa o positiva con el estrés psicosocial, IRE-total y sus componentes: vegetativo, emocional, cognitivo y conductual. Para el anti-HSP60 se observó correlación lineal directa con las LCU, IRE-emocional e IRE-cognitivo.

Gráfico N° 6.
Correlación entre LDL-oxidada y anti-HSP60.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014



Fuente: Cálculos propios; * Correlación significativa $P < 0,05$

En diagrama de dispersión entre el LDL-oxidada y los anti-HSP60 muestra una correlación lineal directa con $P(0,000)$ entre estos dos marcadores bioquímicos.

1. Estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés, LDL-Oxidada y anti-HSP60 como factores de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV).

Al considerar la mediana como punto de corte para cada una de las variables bajo estudio (Tabla N° 8) y con éstos discriminar entre los grupos ACV y control, estableciendo un punto de corte referencial que diferencie la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) y factor de riesgo, se presentaron los resultados mostrados en las Tablas 9 a la 15 y el Gráfico N° 7.

Tabla N° 8.
Puntos de corte percentil 50 para las variables en estudio
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

Variables	Percentil (50)
IRE Vegetativo (Puntos)	0,67
IRE Emocional (Puntos)	0,9
IRE Cognitivo (Puntos)	1
IRE Conductual (Puntos)	1,14
IRE total (Puntos)	0,86
Estrés Psicosocial (LCU) (Puntos)	184

LDL-Oxidada (ng/mL)	7825
Anti-HSP60 (ng/dmL)	27138

Fuente: Cálculos propios

La mediana para las LCU por Holmes y Rahe fue de 184 puntos, IRE-total 0,86 puntos, IRE-vegetativo 0,67 puntos, IRE-emocional 0,9 puntos, IRE-cognitivo un (1) punto e IRE-conductual 1,14 puntos; para los parámetros bioquímicos se tiene para el LDL-oxidada 7.825 ng/mL y anti-HSP60 27.138 ng/mL.

Tabla Nº 9.
Estrés psicosocial como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV).
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

Estrés psicosocial Holmes y Rahe (LCU)	Grupo		P	OR	IC-OR (Li-Ls)
	ACV	Control			
	Total (%)	Total (%)			
≥ 184	28 (87,50%)	4 (12,50%)	0,000*	49**	11,14 – 215,60
< 184	4 (12,50%)	28 (87,50%)			

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas en la incidencia de ACV; ** OR (Odds Ratio) significativo Li > 1

Para valores de LCU ≥ 184 se tiene 49 veces más probabilidad de padecer ACV con respecto a los que presentan niveles menores a este valor, siendo la incidencia significativamente superior (87,50%) con P(0,000) en el grupo con ACV isquémico.

Tabla N° 10.
Índice de reactividad al estrés como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV).
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

IRE	Grupo		P	OR	IC-OR (Li-Ls)
	ACV	Control			
	Total (%)	Total (%)			
Vegetativo					
$\geq 0,67$	23 (76,67%)	7 (23,33%)	0,000*	9,45**	2,94 - 30,36
$< 0,67$	8 (25,81%)	23 (74,19%)			
Emocional					
$\geq 0,90$	26 (81,25%)	6 (18,75%)	0,000*	18,78**	5,35 - 65,90
$< 0,90$	6 (18,75%)	26 (81,25%)			
Cognitivo					
≥ 1	23 (69,70%)	10 (30,30%)	0,002*	5,62**	1,92 - 16,45
< 1	9 (29,03%)	22 (70,97%)			
Conductual					
$\geq 1,14$	26 (78,79%)	7 (21,21%)	0,000*	15,48**	4,57 - 52,46
$< 1,14$	6 (19,355)	25 (80,65%)			
Total					

≥ 0,86	28 (87,50%)	4 (12,50%)	0,000*	49**	11,14 - 215,60
< 0,86	4 (12,50%)	28 (87,50%)			

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas en la incidencia de ACV; ** OR (Odds Ratio) significativo Li > 1

Para valores del IRE-total \geq al punto de corte (0,86) la incidencia fue significativamente ($P=0,000$) superior (87,50%) en individuos con ACV, presentándose 49 veces más probabilidad de presentar esta enfermedad que en individuos con valores inferiores a este valor. Cada uno de los componentes del IRE presentó mayor incidencia de individuos (significativas $P<0,05$) con niveles superiores al punto de corte establecidos en el grupo con ACV isquémico.

Tabla N° 11.
Parámetros bioquímicos como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV).
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela.
Período noviembre 2009 – octubre 2014

Parámetros bioquímicos	Grupo		P	OR	IC-OR (Li-Ls)
	ACV	Control			
	Total (%)	Total (%)			
LDL-Oxidada					
≥ 7.825 ng/mL	24 (75,00%)	8 (25,00%)	0,000*	9,00**	2,90 – 27,91
< 7.825 ng/mL	8 (25,00%)	24 (75,00%)			
Anti-HSP60					
≥ 27.138 ng/mL	23 (71,88%)	9 (28,12%)	0,001*	6,53**	2,20 – 19,42
< 27.138 ng/mL	9 (28,12%)	23 (71,88%)			

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas en la incidencia de ACV; ** OR (Odds Ratio)
significativo $Li > 1$

Para la LDL-oxidada la incidencia por encima del punto de corte de 7.825 ng/mL fue significativamente superior (75%) con $P(0,000)$ en el grupo con ACV; presentándose 9 veces más probabilidad de presentar esta enfermedad en niveles superiores al punto de corte. Igualmente, para anti-HSP60 se observó mayor incidencia de individuos con valores superiores al punto de corte (27.138 ng/mL) en los pacientes con ACV (71,88%) con diferencias significativas $P(0,001)$, mostrando una probabilidad de 6,53 veces de presentar enfermedad cerebrovascular isquémica sobre al resultar sus niveles por encima del referido punto.

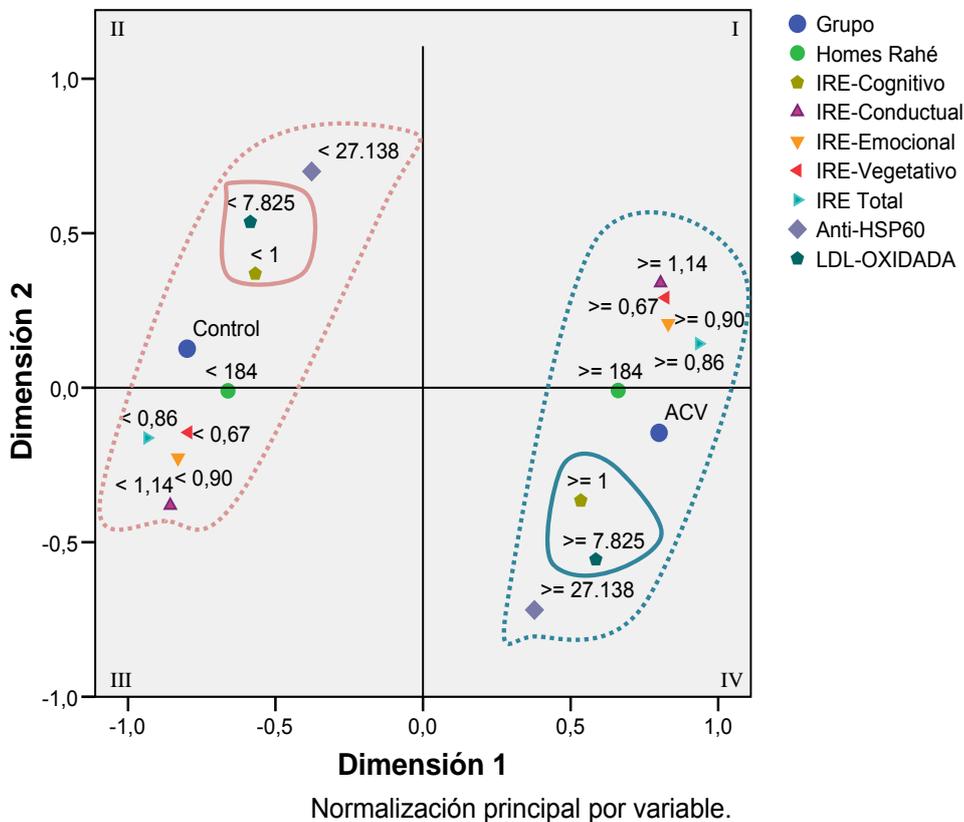
Gráfico N° 7.

Análisis de correspondencia múltiple para puntos de cortes en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV).

Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA. Mérida-Venezuela.

Período noviembre 2009 – octubre 2014

Diagrama conjunto de puntos de categorías



En el espacio bidimensional se observa clara discriminación entre los grupos ACV y control y los puntos de cortes establecidos; para el cuadrante I y IV se tiene a los pacientes con ACV relacionados con valores mayores o iguales a los puntos de corte; mientras que para el cuadrante II y III se tiene a los controles relacionados con valores menores a los puntos de corte. Se observa mayor relación entre el punto de corte del IRE-Cognitivo y del LDL-oxidada.

Tabla Nº 12.
Estrés psicosocial como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) según sexo.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

Estrés psicosocial (LCU) / sexo	Grupo		P	OR	IC-OR (Li-Ls)
	ACV	Control			
	Total (%)	Total (%)			
Femenino					
≥ 184	13 (86,67%)	2 (13,33%)	0,000*	30,33**	4,35 - 211,49
< 184	3 (17,65%)	14 (82,35%)			
Masculino					
≥ 184	15 (88,24%)	2 (11,76%)	0,000*	105**	8,55 - 1290,11
< 184	1 (6,67%)	14 (93,33%)			

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas en la incidencia de ACV; ** OR (Odds Ratio) significativo Li > 1

Tomando el factor de riesgo según sexo, para LCU ≥ 184 en el Holmes y Rahe se observa para el sexo femenino 30,33 y masculino 105 veces, más probabilidad de presentar ACV que aquellos con un puntaje menor a 184.

Tabla N° 13.
Índice de reactividad al estrés como factor de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) en el sexo femenino.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

IRE		P	OR	IC-OR
-----	--	---	----	-------

	Grupo				(Li-Ls)
	ACV	Control			
	Total (%)	Total (%)			
Vegetativo					
≥ 0,67	13 (72,22%)	5 (27,78%)	0,008*	13,00**	2,07 – 81,49
< 0,67	2 (16,67%)	10 (83,33%)			
Emocional					
≥ 0,90	13 (72,22%)	5 (27,78%)	0,011*	9,53**	1,85 – 49,20
< 0,90	3 (21,43%)	11 (78,57%)			
Cognitivo					
≥ 1	12 (66,67%)	6 (33,33%)	0,037*	5,00**	1,10 – 22,82
< 1	4 (28,57%)	10 (71,43%)			
Conductual					
≥ 1,14	12 (75,00%)	4 (25,00%)	0,012*	9,00**	1,82 – 44,59
< 1,14	4 (25,00%)	12 (75,00%)			
Total					
≥ 0,86	14 (77,78%)	4 (22,22%)	0,001*	21,00**	3,26 – 135,48
< 0,86	2 (14,29%)	12 (85,71%)			

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas en la incidencia de ACV; ** OR (Odds Ratio) significativo Li > 1

Para el sexo femenino, se observó diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) para todos los puntos de cortes establecidos del índice de reactividad al estrés; en cuanto al riesgo de presentar la enfermedad (por valores iguales o mayores al punto de corte), la mayor probabilidad se presenta para el IRE total.

Tabla N° 14.
Índice de reactividad al estrés como factor de riesgo en la enfermedad
cerebrovascular isquémica (ACV) en el sexo masculino.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

IRE	Grupo	P	OR	IC-OR
-----	-------	---	----	-------

	ACV	Control			(Li-Ls)
	Total (%)	Total (%)			
Vegetativo					
≥ 0,67	10 (83,33%)	2 (16,67%)	0,009*	10,83**	1,79 – 65,55
< 0,67	6 (31,58%)	13 (68,42%)			
Emocional					
≥ 0,90	13 (92,86%)	1 (7,14%)	0,000*	65**	6,00 – 703,67
< 0,90	3 (16,67%)	15 (83,33%)			
Cognitivo					
≥ 1	11 (73,33%)	4 (26,67%)	0,032*	6,60**	1,40 – 31,05
< 1	5 (29,41%)	12 (70,59%)			
Conductual					
≥ 1,14	14 (82,35%)	3 (17,65%)	0,000*	30,33**	4,35 – 211,49
< 1,14	2 (13,33%)	13 (86,67%)			
Total					
≥ 0,86	14 (100,00%)	0 (0,00%)	0,000*	1/	-
< 0,86	2 (11,11%)	16 (88,89%)			

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas en la incidencia de ACV; ** OR significativo Li > 1

Nota: OR= Odds Ratio; 1/ no se puede calcular odds ratio

El sexo masculino presentó diferencias significativas para la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) con respecto a los puntos de corte establecidos para el IRE. Cabe destacar la diferencia del IRE-total con P(0,000), donde la incidencia para valores $\geq 0,86$ fue de 100% en el grupo con ACV en contraste al 11,11% en valores $< 0,86$ y la mayor probabilidad (30,33) de padecer ACV para el IRE-conductual, al estar expuestos a valores iguales o mayores a su punto de corte de 1,14.

Tabla N° 15.
Parámetros bioquímicos como factor de riesgo en la enfermedad
cerebrovascular isquémica (ACV) según sexo.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.
Mérida-Venezuela. Período noviembre 2009 – octubre 2014

Parámetros bioquímicos/	Grupo	P	OR	IC-OR
-------------------------	-------	---	----	-------

sexo	ACV	Control			(Li-Ls)
	Total (%)	Total (%)			
Femenino					
LDL-oxidada					
≥ 7.825 ng/mL	13 (68,42%)	6 (31,58%)	0,029*	7,22**	1,44 - 36,22
< 7.825 ng/mL	3 (23,08%)	10 (76,92%)			
Anti-HSP60					
≥ 27.138 ng/mL	13 (81,25%)	3 (18,75%)	0,001*	18,78**	3,18 - 110,84
< 27.138 ng/mL	3 (18,75%)	13 (81,25%)			
Masculino					
LDL-oxidada					
≥ 7.825 ng/mL	11 (84,62%)	2 (15,38%)	0,003*	15,40**	2,50 - 95,05
< 7.825 ng/mL	5 (26,32%)	14 (73,68%)			
Anti-HSP60					
≥ 27.138 ng/mL	10 (62,50%)	9 (37,50%)	0,289	2,78	0,66 - 11,62
< 27.138 ng/mL	9 (37,50%)	10 (62,50%)			

Fuente: Cálculos propios; * diferencias significativas en la incidencia de ACV; ** OR significativo Li > 1

Nota: OR= Odds Ratio

Se observa que, en el caso de la LDL-oxidada con P(0,029) en el sexo femenino y P(0,003) en el masculino, mayor incidencia de valores superiores al punto de corte de 7.825 ng/mL, en el grupo con ACV; mostrando 7,22 y 15,40 veces mayor , probabilidad de riesgo. Para el anti-HSP60 la diferencia solo se observó en el sexo femenino con P(0,001), donde para valores ≥ 27.138 ng/mL la incidencia se ubicó en 81,25% en el grupo de ACV; el riesgo fue de 18,78 veces más al estar expuesta a valores de anti-HSP60 ≥ 27.138.

DISCUSIÓN.

2. Comparación del estrés psicosocial

Al comparar los promedios de las LCU obtenidas al aplicar la escala de estrés psicosocial de Holmes y Rahe a los pacientes con ACV y grupo control; los resultados muestran que el nivel promedio del grupo con ACV fue superior respecto al grupo control, con diferencias estadísticamente significativas ($P(0,000)$).

El nivel promedio del grupo de ACV resultó en 369,75 LCU, lo cual corresponde a un estrés psicosocial elevado; en contraste al grupo control que presentó promedio de 124,44 LCU correspondiente a un nivel de estrés psicosocial bajo (ver Tabla N° 2). Así, al analizar la severidad del estrés psicosocial entre los grupos, mostrada en la Tabla N° 3; se observó con $P(0,000)$ que en el grupo de pacientes con ACV el mayor porcentaje (71,88%) presentó niveles altos de estrés psicosocial, mientras que en el grupo de controles la mayoría (59,38%) mostró niveles bajos y 40,62% moderados, sin individuos en el nivel elevado (ver Tabla N° 3).

Si bien es cierto, el promedio de LCU del grupo ACV es inferior a los encontrados por Quintini (2008) en mujeres y Peña (2009) en hombres con cardiopatía isquémica, ambas investigaciones coinciden con la presente en que los niveles promedio del grupo con la enfermedad fueron superiores al grupo de control aparentemente sano. De acuerdo a lo postulado por Holmes y Rahe (1967), la mayoría de los pacientes con ACV presentaban para el período de seis meses a un año previos al ACV un riesgo elevado a presentar enfermedad, en contraposición al grupo control que en su

mayoría presentó baja tendencia a enfermedad, o una tendencia moderada a la misma (Tabla N° 3); evidenciándose, además en el Gráfico N° 1 que al hacer la comparación individual del estrés psicosocial, el 93,5% de los integrantes del grupo con ACV mostró mayor nivel de LCU que su respectivo individuo control con similar edad e igual sexo.

En este sentido, cabe mencionar la investigación de Fernández et al. (2002) en un grupo de individuos que había padecido ACV isquémico, en el cual estudiaron los eventos vitales sucedidos un año previo al infarto cerebral; concluyendo que el estrés psicosocial, derivado de acontecimientos vitales estresantes, aumentaba el riesgo a padecer ACV, fundamentalmente en individuos hipertensos o con patrón de conducta de tipo A. Así mismo, en el trabajo de Mann (2011) se encontró que haber sufrido un evento vital estresante importante en el año anterior cuadruplicaba el riesgo de ACV.

Esto último concuerda con la investigación de Hoffman et al. (2004), donde fue aplicada la escala de eventos vitales de Holmes y Rahe en individuos con ACV, encontrando, que 36% de los individuos estudiados presentaron un evento adverso ubicado dentro de los 10 primeros ítem de la referida escala.

3. Comparación del índice de reactividad al estrés

En la comparación del índice de reactividad al estrés entre los grupos de pacientes con ACV y controles (sanos); se observó diferencias significativas tanto para el IRE total como para los distintos componentes del IRE con $P(0,000)$ para cada comparación. En todos los casos, los índices promedio de los pacientes con ACV fueron superiores a los del grupo control; y tanto el IRE Total como cada uno de sus componentes presentaron niveles promedio en un nivel considerado alto mientras que el caso del grupo control dichos promedios, estuvieron en el orden de bajo o medio-alto (IRE total 1,30 ACV y 0,61 control; IRE-vegetativo 1,05 ACV y 0,51 control, IRE-emocional 1,49 ACV y 0,60 control, IRE-cognitivo 1,35 ACV y 0,68 control; y IRE-conductual 1,52 ACV y 0,71 control (ver Tabla N° 4).

En este mismo orden de ideas, el gráfico N° 2 se presentan las diferencias absolutas y porcentuales entre los grupos ACV y controles con relación al índice de reactividad al estrés total y en sus distintos componentes: para el IRE total la diferencia porcentual fue de 113,11%; entre los componentes del IRE se tiene que la mayor diferencia se observó para el IRE-emocional con 148,33%, seguido del IRE-conductual 114,08%, IRE-vegetativo 105,88% e IRE-cognitivo 98,53%. Esto pone en evidencia que los niveles del grupo de pacientes llegan a superar al doble de los niveles presentados por el grupo control.

A su vez, al calcular los porcentajes según las categorías del índice de reactividad al estrés comparando los pacientes con ACV con los controles (sanos), se hallaron diferencias con $P(0,000)$ para el IRE total, IRE-vegetativo, IRE-emocional, IRE-

Conductual y con $P(0,001)$ para el IRE-cognitivo; donde para los pacientes con ACV la mayoría presenta niveles demasiados altos, en cada uno de los componentes, ubicándose el 71,38% IRE-total, 50% IRE-vegetativo, 68,74% IRE-emocional, 50% IRE-cognitivo y 81,25% para el IRE-Conductual; mientras que para el grupo control la mayoría presenta niveles bajos o medio- altos (ver Tabla N° 5).

Ahora bien, el índice de reactividad al estrés es catalogado por González (1991) como una variable típica de los factores internos de estrés, relacionadas por las respuestas del individuo, su adaptación, defensa y neutralización del mismo; actuando como un modulador de los sucesos vitales, que en niveles bajos los atenúan y en niveles elevados los potencian (González, 2010). En el caso de la muestra poblacional estudiada, pudiera decirse que el grupo con ACV isquémico presenta una sinergia de los factores psicológicos del estrés en virtud que en su mayoría presentan niveles elevados de sucesos vitales y reactividad al estrés, con lo cual presentarían un índice global de estrés que los expone mayormente a procesos patológicos que, en este caso, parece indicar está representada por la enfermedad cerebrovascular isquémica.

4. Comparación de los marcadores bioquímicos.

Al efectuar la comparación estadística de las concentraciones promedio de los marcadores bioquímicos, se observa que para la LDL-oxidada y el anti-Hsp60 existieron diferencias en los valores promedios de estos parámetros entre los grupos ACV y control con $P(0,000)$; dichas diferencias se reflejan en promedios de concentración más elevado en los pacientes con ACV que el grupo control (el LDL-oxidada con promedio de 10.800,94 ng/L para el grupo ACV y de 6.196,56 ng/mL en el control; anti-Hsp60 con promedio de 47.577,41 ng/mL en los pacientes con ACV y 22.367,84 ng/mL en el control) (ver Tabla N° 6).

Las diferencias descritas anteriormente se presentan en el gráfico N° 3 en valores absolutos y porcentuales en base a los valores promedios de los pacientes con ACV con respecto al grupo control, para el anti-Hsp60 la diferencia fue 112,70%, mientras que para el LDL-oxidada fue de 74,31%; lo cual denota que las mismas son bien marcadas.

De igual manera, los Gráficos N° 4 y N° 5 muestran las diferencias individuales de la concentración de LDL-oxidada y anti-HSp60, respectivamente, entre cada pareja de individuos (paciente del grupo ACV y su correspondiente individuo control de igual sexo y similar edad). Los mismos indican que la mayoría de los pacientes (78,13% para LDL-oxidada y 96,88% para anti-HSP60) presentan mayor concentración de ambos parámetros.

Este hallazgo en las concentraciones de LDL-oxidada concuerdan con los estudios efectuados por investigadores en otros tipos de enfermedades subsecuentes a

aterosclerosis, como Holvoet et al. (1998) y Johnston et al. (2002) en pacientes con enfermedad coronaria, los cuales presentaron niveles plasmáticos significativamente elevados de LDL-oxidada, en comparación con sujetos de control sanos. Al igual que la investigación de Sigurdardottir et al. (2002) donde fue detectada una relación entre las concentraciones plasmáticas de LDL-oxidada en pacientes con síndrome metabólico y cifras bajas de LDL-oxidada en pacientes sin factores de riesgo. Mas, sin embargo, contrastan a los resultados de Boronat et al. (2005), en un estudio del perfil lipídico y estado oxidativo en pacientes con enfermedad vascular periférica en distintos estadios, donde no se encontraron niveles mayores de LDL-oxidada a medida que progresa la patología, lo cual fue atribuido a que los pacientes no presentaban factores de riesgo añadidos y que siendo conocedores de su enfermedad tomaban en cuenta las recomendaciones lipídicas.

No obstante, Brito et al (2010) señalan que la determinación directa de la LDL-oxidada en el plasma, o en el suero, es complicada, dada las posibles modificaciones in vivo de las muestras y por la variedad de partículas, en diferentes niveles de oxidación, que pueden ser identificadas y cuya significancia, en términos predictivos de enfermedad, es también potencialmente variable, además de la alta concentración de sustancias antioxidantes presentes en la sangre.

Por otro lado, estos autores señalan que no hay correlación con la cantidad de LDL-oxidada en la placa aterosclerótica, protegida en la intimidad del subendotelio; pues estiman que en individuos sanos, la concentración plasmática media de LDL-oxidada

sea de aproximadamente 0,1 ng/ μ g de la porción proteica de la LDL, sugiriendo que la localización primaria del análisis de interés podría no ser la circulación (Brito et al, 2010). Lo cual es apoyado por Boronat et al. (2005) quienes cuestionan los niveles circulantes de la misma debido a que, si la lipoproteína oxidada se deposita en el espacio sub-íntimo, no estaría en el plasma.

En cuanto a la concentración de anticuerpos anti-HSP60, los valores promedio superiores en el grupo con ACV (Tabla N° 6), así como el alto porcentaje de este grupo con mayor nivel que sus controles respectivos (Gráfico N°5) concuerda con los hallazgos de Quintini (2008) y Peña (2009) en mujeres y hombres, respectivamente, con cardiopatía isquémica. Así como, Zhu (2001), demostraron una relación significativa entre los Anti-Hsp60 con la presencia y severidad de la enfermedad angiográficamente significativa (>70% de obstrucción).

Por otra parte, Xiao et al. (2005) aportan los primeros datos que confirman la asociación entre altos títulos de Anti- Hsp60 y la arterioesclerosis carotídea temprana indicando la posibilidad que ésta proteína esté involucrada en los procesos pro-inflamatorios asociados con la patología inicial del vaso sanguíneo.

5. Correlación entre marcadores bioquímicos y psicológicos

Al efectuar los análisis estadísticos de correlación, considerando todos los individuos bajo estudio, es decir pacientes ACV y controles como un solo grupo, se observó que el LDL-Oxidada presentó relación lineal directa o positiva con las LCU de la escala de Home y Rahe $P(0,001)$; el IRE-total $P(0,001)$, IRE-vegetativo $P(0,008)$, IRE-emocional $P(0,002)$, IRE-cognitivo $P(0,012)$ e IRE-conductual $P(0,005)$.

En el caso de los anticuerpos anti-HSP60, se observó correlación lineal directa con el estrés psicosocial $P(0,001)$, IRE-emocional $P(0,048)$, e IRE-cognitivo $P(0,023)$.

Estas relaciones obedecen a la condición de los individuos, es decir enfermos (ACV) y sanos, e indica que a medida que incrementan el estrés psicosocial y el índice de reactividad al estrés, las concentraciones de los parámetros bioquímicos LDL-Oxidada y anti-HSP60 se incrementa también y viceversa (ver Tabla N° 7).

En el Gráfico N° 6 se presenta el diagrama de dispersión entre el LDL-oxidada y el Anti-HSP60, el cual muestra una correlación lineal directa con $P(0,000)$, donde al incrementarse el LDL-oxidada también se incrementa el Anti-HSP60 y viceversa. Este hecho es concordante con lo señalado por Delgado, Vásquez & Fernández, (2012) sobre la existencia de una interrelación entre las LDL-oxidada y las HSP, donde la LDL-oxidada, por sí mismas, pueden desencadenar un aumento de la expresión de HSP por parte de las células endoteliales. Así como lo establecido por Knoflach, Bernard & Wick (2005), en su teoría inmunológica de la aterosclerosis. Considerando la LDL oxidada dentro de los estresores que generan la potenciación

de la expresión de anticuerpos contra la HSP60 al alterarla químicamente e inducir una reacción autoinmune (Peña, 2009).

6. Estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés, LDL-Oxidada y anti-HSP60 como factores de riesgo en la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV).

Al proceder a determinar puntos de corte que pudieran discriminar entre los grupos ACV y control, se lograron establecer puntos de corte referencial que diferencian la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) y factor de riesgo; tal como se muestra en la Tabla N° 8.

En base a ello, para el estrés psicosocial, se tiene con $P(0,000)$ diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) para el punto de corte establecido, donde para valores del LCU ≥ 184 la incidencia fue de 87,50% en contraste al 12,50% que se observó para valores < 184 . Por otra parte, para valores ≥ 184 se tiene 49 veces más probabilidad de parecer ACV con respecto a los que presentan valores < 184 (ver Tabla N° 9). Esto indica que, si se toman en cuenta los niveles de tendencia a enfermedad de Holmes y Rahe, en la población estudiada, con LCU en el orden de estrés psicosocial considerado moderado hay casi un 50% de riesgo a padecer la enfermedad, lo cual pudiera representar un hallazgo importante al respecto.

Con relación al índice de reactividad al estrés, se observó para el IRE total diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) con $P(0,000)$, donde para valores del IRE-total $\geq 0,86$ la incidencia fue de 87,50% y para valores $< 0,86$ fue 12,50%; asimismo, para valores $\geq 0,86$ se tiene 49 veces más probabilidad de presentar ACV con relación a los que presentan valores $< 0,86$. Este resultado es idéntico al encontrado en el estrés psicosocial medido mediante la escala de Holmes y Rahe. De igual manera, destaca que en la población estudiada bastan valores de índice de reactividad a estrés en el orden medio-alto para incrementar casi en un 50% el riesgo a enfermedad cerebrovascular isquémica. Esto pudiera tener una posible explicación en la potenciación que ejercen los factores externos (estrés psicosocial) e internos (IRE) del estrés.

Para el resto de los componentes del IRE, se encontraron puntos de corte en nivel alto para IRE-cognitivo (1) y el conductual (1,14) y en el orden medio-alto para y IRE-emocional (0,9) y vegetativo (0,67) (ver Tabla N° 9). Se encontraron diferencias significativas $P<0,05$ en la incidencia de ACV y factores de riesgo para todos los puntos de corte establecidos; resultando que la incidencia y la aproximación al riesgo para valores mayores o iguales al punto de corte en el IRE-emocional fue de 81,25% con Odds Ratio (OR) de 18,78, IRE-conductual 78,79% (OR 15,48), IRE-vegetativo 76,67% (OR 9,45) e IRE-cognitivo 69,70% (OR 5,62) (ver Tabla N° 10).

Para la LDL-oxidada se tiene diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) con $P(0,000)$, donde para valores \geq al

punto de corte hallado (7.825 ng/mL) la incidencia fue de 75%, a diferencia del 25% para valores < 7.825 ng/mL; encontrándose que, para valores \geq 7.825 ng/mL se tiene 9 veces más probabilidad de presentar ACV.

Con relación a anticuerpos anti-HSP60 se observó con $P(0,001)$ diferencias significativas en la incidencia de ACV. Para valores \geq 27.138 ng/mL (punto de corte) la incidencia fue de 71,88% y para valores < 27.138 ng/mL ésta se ubicó en 28,12%. Igualmente, para valores \geq 27.138 ng/mL se tiene 6,53 veces más probabilidad de presentar enfermedad cerebrovascular isquémica (ver Tabla N° 11).

Como se observó anteriormente, los puntos de corte establecidos fueron significativos; sin embargo, sus resultados se muestran de manera individual, por ello se realizó análisis de correspondencia múltiple para mostrar todas las relaciones. Así, en el gráfico N° 7 se presenta en el espacio bidimensional las relaciones de las categorías establecidas por el punto de corte de cada variable asociada a estrés psicosocial, IRE y marcadores bioquímicos.

En dicha gráfica, se observa clara discriminación entre los grupos ACV y control y los puntos de cortes establecidos. Para el cuadrante I y IV se tiene a los pacientes con ACV relacionados con valores mayores o iguales al punto de corte; mientras que para el cuadrante II y III se tiene a los controles, relacionados con valores menores al punto de corte. De manera que, en dicha gráfica se observa la existencia de una evidente diferenciación entre los grupos ACV y control, según los puntos de corte.; a

la vez que, muestra una relación entre el punto de corte del IRE-Cognitivo y del LDL-oxidada.

Por otra parte, se determinó el factor de riesgo según sexo, donde para $LCU \geq 184$ en el Holmes y Rahé se tiene para el sexo femenino y masculino 30,33 y 105 veces más probabilidad de presentar ACV con relación al puntaje < 184 (ver Tabla N° 12)

Para el sexo femenino, se observó diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) para todos los puntos de cortes establecidos del índice de reactividad al estrés; en cuanto al riesgo de presentar la enfermedad por valores iguales o mayores al punto de corte se tiene para el IRE-total 21, IRE-vegetativo 13, IRE-emocional 9,53, IRE-cognitivo 5 e IRE-conductual 9, (ver Tabla N° 13)

El sexo masculino, al igual que el femenino, presentó diferencias significativas para la incidencia de la enfermedad cerebrovascular isquémica (ACV) con respecto a los puntos de corte establecidos para el IRE; sin embargo, cabe destacar la diferencia del IRE-total con $P(0,000)$, donde la incidencia de ACV para valores $\geq 0,86$ fue de 100% en contraste al 11,11% en valores $< 0,86$; y del IRE-emocional con $P(0,000)$ donde para valores $\geq 0,90$ la incidencia se ubicó en 92,86 y para valores $< 0,90$ en 16,67%; en cuanto a las veces de padecer la enfermedad esta fue 65 IRE-emocional, 30,33 IRE-conductual, 10,83 IRE-vegetativo y 6,60 IRE-cognitivo al estar expuestos a valores iguales o mayores al punto de corte (ver Tabla N° 14)

En cuanto a los marcadores bioquímicos se observó diferencias en la incidencia de ACV para la LDL-oxidada con $P(0,029)$ en el sexo femenino y $P(0,003)$ en el masculino. Para valores ≥ 7.825 ng/mL ésta, la incidencia fue de 68,42% y 81,25% respectivamente; mientras que el riesgo fue de 7,22 y 15,40 veces más para valores de la LDL-oxidada ≥ 7.825 ng/mL.

Por su parte, para el anti-HSP60 la diferencia solo se observó en el sexo femenino con $P(0,001)$, donde para valores ≥ 27.138 ng/mL la incidencia se ubicó en 81,25% y para valores < 27.138 ng/mL en 18,75%; el riesgo fue de 18,78 veces más al estar expuesta a valores de anti-HSP60 ≥ 27.138 (ver Tabla N° 15).

No se encontraron en la bibliografía investigaciones con las cuales contrastar de esta investigación a este respecto.

CONCLUSIONES.

Dados los resultados obtenidos en la muestra objeto de estudio, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- ⊙ Los individuos que han padecido ACV isquémico presentan niveles de estrés psicosocial, índice de reactividad al estrés y de los marcadores bioquímicos LDL-oxidada y anti-HSP60, mayores que los individuos sanos.
- ⊙ Existe una relación directa y concordante entre los componentes del índice global de estrés (estrés psicosocial y reactividad al estrés) y los marcadores bioquímicos LDL-oxidada y anticuerpos contra la proteína de estrés (anti-HSP60), que sugiere que estos tienen una relación fisiopatogénica con el ACV isquémico.
- ⊙ El estrés psicosocial e índice de reactividad al estrés, así como los marcadores bioquímicos LDL-oxidada y anti-HSP60 pueden ser propuestos como factores de riesgo a ACV isquémico.

De allí que, es importante que la población tome en cuenta medidas preventivas que contribuyan al control de su índice de reactividad al estrés como modulador de su estrés psicosocial, inductores de los factores bioquímicos asociados al estrés oxidativo aquí estudiados y, por lo tanto de la enfermedad cerebrovascular isquémica, de tal alta incidencia en la misma.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

1. Abdalla, M., Fumagalli, A.I., Galantucci, S., Garib, A., Comi, G., Kwan, J. & Corea, F. (2007). Factores de riesgo microbiológicos para enfermedades cardio y cerebrovasculares: potenciales opciones terapéuticas. *Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio*, 15, 105-110.
2. Aguayo, F. (2007). El estrés psicosocial como factor predisponente de enfermedad aguda en pacientes de Medicina Familiar del Policlínico Central de la Caja de la Caja Nacional de Salud, La Paz en los meses de Junio, Agosto y Septiembre 2007. *Revista Paceña de Medicina Familiar*, 4(6), 101-105.
3. Aidar, J.F., Silva, A.J., Reis, V.M., Carneiro, S., Strong, K., Mathers, C. & Bonita, R. (2007). Proyecciones para el 2030. Prevención del accidente cerebrovascular. *Revista The Lancet Neurology*, 6, 182–87.
4. Ameriso, F., Ruiz, A. & Pérez, M. (2004). Infección, inflamación e ictus cerebral. *Revista Española de Cardiología*, G(4), 7-12.
5. Ameriso, S. (2009). Inflamación/Infección y enfermedad cerebrovascular. *Revista de Neurología Argentina*, 1(1), 35- 40.

6. Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse. (2010a). OLAB IgG anti oxidised low density lipoprotein enzyme immunoassay for the quantitative determination of Human IgG autoantibodies against oxidised low density lipoprotein in serum CAT. NO. BI-20032.
7. Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse. (2010b). Oxidised LDL. Enzyme immunoassay for the quantitative determination of oxidised LDL in human edta plasma and serum CAT. NO. BI-20042. 12 X 8 tests.
8. Boronat, M., García, M., Parra, S., Albaladejo, M. & Martínez, P. (2005). LDL oxidada: el cuarto colesterol. *Actualidades 2005*. 2-11
9. Brito, A., Von Mühlen, C., Ake, M., Bodanese, R., Gottlieb, V. & Bodanese, L. (2010). Anticuerpos contra LDL-ox y síndrome coronario agudo. *Arq Bras Cardiol*, 95(1), 47-54.
10. Campo, J., Reyes, J., Ortiz, C., Quintero, L. & Herrera, J. (2006). Niveles de la presión arterial y de estrés psicosocial en estudiantes de la Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali, Colombia. *Colombia Médica*, 37(1), 21-25.
11. Castillo, S., Bonneau, G., Sánchez, A., Ceballos, B., Malarczuc, C., Medina, G., et al. (2005). Factores de riesgo aterogénico y síndrome metabólico.

- Estudio en un grupo de empleados públicos hospitalarios de Posadas, Misiones, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(4), 445-52.
12. Celis, J., Hernández, D. & King, L. (2006). Enfermedad cerebrovascular *Guía Neurológica 8.*, Capítulo 3 (pp 31-44). Extraído el 09 de Mayo, 2014, de <http://www.acnweb.org/guia/g8cap3.pdf>
13. Centro de Información Cardiovascular del Texas Heart Institute. (2014a). Accidente cerebrovascular. Extraído el 10 de Junio, 2015, de http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/strok_sp.cfm
14. Centro de Información Cardiovascular del Texas Heart Institute. (2014b). Tipos de accidentes cerebrovasculares. Extraído el 10 de Junio, 2015, de http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/stroktys.cfm
15. Cirpa, V. (2013). *LDL oxidada correlacionada a la tabla de predicción de riesgo cardiovascular de la OMS/ISH y las fracciones del colesterol, en pacientes del Centro Médico Quirúrgico Boliviano Belga de Cochabamba.* Tesis de grado para optar al título de Magister en Bioquímica Clínica, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

16. Comisión de nuevos factores de riesgo (2001). *Revista Argentina de Cardiología*, 1(69), 1-14.
17. Costa, S., Barontini, M., Forcada, P., Carrizo, P. & Almada, L. (2010). Estrés psicosocial y baja resiliencia, un factor de riesgo de hipertensión arterial. *Revista Argentina de Cardiología*, 5(78), 425-431.
18. De la Serna, P. (2004). Trastornos psiquiátricos en los accidentes cerebrovasculares. *Revista de la Sociedad Española de Médicos Generales y de Familia*, 66, 419-425.
19. Delgado, L., Vázquez, A. & Fernández, E. (2012). Alternativas inmunoterapéuticas para el tratamiento de la aterosclerosis. [versión electrónica]. *Vaccimonitor*, 21(1), 8-42.
20. Dulín I, E. (2010). *Enfermedad cardiovascular, hiperhomocisteinemia y proteínas de choque térmico*. Tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España
21. Duval, F., González, F. & Rabia, H. (2010). Neurobiología del estrés. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 48(4), 307-318.
22. Elejalde, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 326-335.

23. Escosa, L., Moreno, E., Galache, J., Monzón, F., Salazar, J., Sánchez, J. & Placer, L. (2004). Inflamación y aterosclerosis 2ª parte. Posibles agentes causantes. Tratamientos y ensayos clínicos. *Revista de la Sociedad Aragonesa de Cardiología*, 2(7).
24. Estrada, G. & Estrada, M. (2008). Factores de riesgo para enfermedad aterotrombótica. Capítulo 5. En: *Enfermedad arterial coronaria*. (pp. 397-407).
Extraído el 11 de Mayo, 2010, de <http://www.scc.org.co/libros/libro%20cardiologia/capitulo5.pdf>.
25. Fàbregas, N. & Valero, R. (2001). Fisiología cerebral y monitorización neurológica y de la profundidad anestésica (*Societat Catalana d'Anestesiologia. Programa Residents segon any*) Abril.
26. Faxon, D., Fuster, V. Libby, P y col. (2004) Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: Pathophysiology , 109: 2617-2625.
27. Fenollar, M., Parra, M., Albaladejo, M. & Cassinello, N. (2005). Perfil lipídico y estado oxidativo en pacientes con enfermedad vascular periférica. *Anales de Cirugía Cardíaca y Vascular*, 11(3), 124-128.

28. Fernández, M. & Patiño, C. (2007). La Inflamación como factor causal emergente de la enfermedad cardiovascular. *Universitas Scientiarum North America*, 12(1), 15-33.
29. Fernández, O., Buergo, M. & López, M. (2012). Hiperglicemia post-ictus. *Rev Cubana Neurol Neurocir*, 2(2):144-9.
30. Fernández, O., Verdecie, O., Chávez, L., Álvarez, M. & Fiallo, M. (2002). Patrón de conducta de tipo A y acontecimientos vitales como riesgo para el infarto cerebral *Revista de Neurología*, 34(7), 622-627.
31. García, B. & Leza, J. (2008). Mecanismos inflamatorios/antiinflamatorios en el cerebro tras la exposición a estrés. *Rev Neurol*, 46 (11): 675-683
32. González, J. (1991). Factores de estrés y vulnerabilidad a la enfermedad. *Monografías de psiquiatría*, 3(3), 1-5.
33. González, J. (2006). *Crisis emocionales*. 1era ed. Madrid: Editorial Espasa Calpe, S.A.
34. González, J. (2010). *Los síndromes de estrés*. Madrid: Editorial Síntesis, S. A.

35. González, J. & Morera, A. (1983a). La valoración de sucesos vitales: Adaptación española de la escala de Holmes y Rahe. *Psiquis*, 4(1), 7-11.
36. González, J. & Morera, A. (1983b). Diferencias objetivas y subjetivas en la puntuación de una escala de sucesos vitales. *Actas Luso-Españolas de Neurología, Psiquiatría y Ciencias Afines*, 11(2), 159-162.
37. González, J., Morera, A. & Monterrey, A. (1989). El índice de reactividad al estrés como modulador del efecto <<sucesos vitales>> en la predisposición a la patología médica. *Psiquis*, 10, 20-27.
38. Henry, M., González, J., de las Cuevas, C., González, I., Gracia, R., Abreu, J., et al. (1991) El índice de reactividad al estrés en pacientes asmáticos crónicos. *Psiquis*, 12, 249-254.
39. Herrera, L. & Delgado, J. (2007). Una redefinición de la controlabilidad en el proceso salud-enfermedad: Revisión teórica-metodológica. *Cuadernos de Medicina Psicosomática y Psiquiátrica de Enlace*, 82, 31-38.
40. Herrera, L. & Delgado, J. (2008). Un acercamiento a la definición de la controlabilidad en el proceso de salud-enfermedad. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 40(3), 475-484.

41. Hoffmann, M., Chichkova, R. & Malek, A. (2004). Emotional Stroke: Clinicoradiologic Profile. *Journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology*, 4(17), 238-241.
42. Holmes, T. & Rahe, R. (1967). The social readjustment rating scale. *Journal of Psychosomatic Research*, 11(2), 213-218.
43. Holvoet, P., Vanhaecke, J., Janssens, S., Van de Werf, F. & Collen, D. (1998). Oxidized LDL and mal-onodialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98,1487–1494.
44. http://en.wikipedia.org/wiki/Holmes_and_Rahe_stress_scale
45. <http://pacotraver.files.wordpress.com/2008/11/holmesyrahe.doc>
46. Hulthe, J. & Fagerberg, B. (2002). Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1162-1167.
47. Hurtado, D. (2015). *La psiconeuroinmunoendocrinología (PNIE) aplicada a la salud laboral*. Extraído el 03 de Agosto, 2015, de <http://hdl.handle.net/10946/2185>

48. Iacovella, J. & Troglia, M. (2003). La hostilidad y su relación con los trastornos cardiovasculares *Revista PSICO-USF*, .6, 55-64.
49. Jeffrey, S. (2008). Estrés psicológico y riesgo de accidente cerebrovascular *Neurology*, 70, 788-794.
50. Johnston, N., Lagerqvist, B., Siegbahn, A. & Wallentin, L. (2002). *Oxidized LDL and unstable coronary artery disease*. Presented at the American Heart Association Scientific Sessions Chicago, USA.
51. Joseph, P. & Gortari, P. (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje *Biotecnología*, 14 (CS3), 65-76.
52. Knoflach, M., Bernhard, D. & Wick G. (2005). Anti-HSP60 Immunity is already associated with atherosclerosis early in life. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051, 323-331.
53. León, J., Sánchez, A. & Matiz, H. (2009). Estrés mental, medio ambiente y enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología*, 3(16), 130-136.

54. Levitan, I., Volkov S., & Subbaiah, P. (2010). Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*, 13(1):39-75.
55. Madamanchi, N., Vendrov, A. & Runge M. (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25, 29-38.
56. Mann, D. (2011). El estrés y una personalidad 'tipo A' podrían aumentar el riesgo de ACV. Extraído el 29 de Julio, 2014. de: <http://consumer.healthday.com/mental-health-information-25/behavior-health-news-56/el-estr-eacute-s-y-una-personalidad-tipo-a-podr-iacute-an-aumentar-el-riesgo-de-acv-668232.html>.
57. Mayoral, P., Macías, J., Peinado, M., Santiago, J. & López, J. (2005). Relación entre el estrés oxidativo y los procesos psicológicos y sociales en personas mayores. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 40(5),285-90.
58. Medialdea, J. & Medina, J. (2007). Vulnerabilidad al estrés y hostilidad: influencia en parámetros de interés cardiovascular y en el síndrome metabólico en pilotos de avión. *Revista de Psiquiatría Biológica*, 3(14), 53-57.

59. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile (2013). Guía Clínica AUGE. Accidente cerebrovascular isquémico en personas de 15 y mas años. Series Guías Clínicas MINSAL 2013. [En línea]. Extraído 08 de Agosto, 2015, de <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7222754637e58646e04001011f014e64.pdf>
60. Monterrey, A., González, J., de las Cuevas, C. & Rodríguez, F. (1991). El índice de reactividad al estrés (IRE): ¿rasgo o estado. *Revista de Psiquiatría de la Facultad de Medicina de Barcelona*, 18(1), 23-27.
61. Mora, O. (2010). *Acontecimientos vitales, índice de reactividad al estrés, psicopatologías y rasgos de la personalidad, en pacientes con disfunción dolorosa de la articulación Temporomandibular*. Tesis de doctorado para obtener el título de Doctor en Patología Existencial e Intervención en Crisis, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
62. Morán, L. (2004). *Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica. Mejoría continua de la etapa pre-analítica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana
63. Moscoso, M. (2009). De la mente a la célula: impacto del estrés en psiconeuroinmunoendocrinología. *LIBERABIT Revista de Psicología*, 15(2), 143-152, 2009.

64. Moyano, E., Icaza, G., Mujica, V., Núñez, L., Leiva, E, Vásquez, M. & Palomo, I. (2011) Patrón de comportamiento tipo A, ira y enfermedades cardiovasculares (ecv) en población urbana chilena. *Revista Latinoamericana de Psicología*. 43(3), 443-453.
65. Mucio, J. (2007). La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(4), 121-128.
66. Naqvi, T., Hyuhn, H. (2009). Cerebrovascular mental stress reactivity is impaired in hypertension. *Cardiovascular Ultrasound*, 7(32), 2-14.
67. Navarrete, S., Huertas, D., Rozo, L. & Ospina, J. (2009). Prevalencia de factores de riesgo para enfermedad cardiovascular en una muestra de pacientes con hipertensión arterial esencial: estudio descriptivo. *Revista Colombiana de Cardiología*, 16(2), 64-70.
68. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2009). *Estadísticas sanitarias mundiales* [En línea]. Extraído 07 de Agosto, 2009, de http://www.who.int/whosis/whostat/ES_WHS09_Full.pdf.

69. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). *Estadísticas sanitarias mundiales* [En línea]. Extraído 08 de Agosto, 2015, de http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/fr/
70. Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M., & Santanam, N. (2010). Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Methods Molecular Biology*, 610, 403-417.
71. Parra, I. & Jonguitud, V. (2007). La fórmula de Friedewald no debe ser utilizada para el cálculo de colesterol de baja densidad en pacientes con triglicéridos elevados. *Rev Mex Patol Clin*, 54(3), 112-115.
72. Peña, J. (2009). *Enfoque integral de la enfermedad coronaria en el hombre. Con especial referencia a los anticuerpos circulantes de la proteína de estrés Anti-Hsp60*. Tesis de Doctorado para optar al título de Doctor e Patología Existencial e Intervención en Crisis, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
73. Peña, J. & Quintini, A. (1999). *Nuevo enfoque en la patogénesis de la aterosclerosis*. Valencia: Dirección de Medios y Publicaciones. Universidad de Carabobo.

74. Pereira, G., Reyes, A., Rodríguez, A., Sánchez, D. & Barrios, V. (2000). Montaje y estandarización para determinar colesterol inmune en suero humano. *Revista Cubana de Endocrinología*, 11(3), 174-80.
75. Plaza, A. (2007). Riesgos psicosociales. Repercusión neurológica del estrés. Extraído el 19 de Marzo, 2012, de http://neurologiadeltabajo.sen.es/pdf/drplaza_2007.pdf.
76. Qingbo, X. & Georg, M. (2004). El papel patogénico de las proteínas de choque térmico en la aterosclerosis. *Infección y autoinmunidad*, 711-727.
77. Quintini, A. (2008). *Los eventos vitales y las necesidades existenciales como factores de riesgo en la mujer con cardiopatía isquémica. Los autoanticuerpos contra la proteína de estrés anti-Hsp60 como marcador biológico para la cardiopatía isquémica*. Tesis de Doctorado para optar al título de Doctor e Patología Existencial e Intervención en Crisis, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
78. Rada, A., Roschman, A., Strauss, M. & Tejero, F. (2011). Expresión de HSP60 en infecciones murinas experimentales por *Trypanosoma evansi*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*, 42 (1).

79. Rodríguez, M., González, J., Hernández, L., De la Hoz, J. & Monterrey, A. (1999). Reactividad al estrés en disfunción temporomandibular. *Psiquiatría.com. Revista Electrónica de Psiquiatría*, 3(3), 1137-3148. Extraído el 13 de Octubre, 2014, de <http://www.psiquiatria.com/revistas/index.php/psiquiatriacom/article/viewFile/475/456/>
80. Roldán, R., Oñate, R., López, F., Cabrezio, M. & Martínez, F. (2006). La ortopantografía como método para la detección de las placas de ateroma calcificadas. *Revista Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11, 261-266.
81. Ruiz, N., Espinoza, M., González J., Leal, U., & Reigosa, A. (2011). LDL Oxidada circulante y anticuerpos contra LDL oxidada según niveles de ácido úrico en mujeres con exceso de peso (Venezuela). *Elsevier: Archivos Cardiología México*, 81(3):188-196.
82. Ruiz, N., González, P. & Suarez, C. (2002). Abordaje del accidente cerebrovascular. *Revista Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 26(4), 93-106.

83. Sabater, G. (2004). Grupo Sabater Análisis. Estrés y su detección por el laboratorio. Nota informativa N° 54. Extraído el 10 de Mayo de 2010 de www.notife.com/noticia/articulo/945274.
84. Salaycik, K., Hayes, M., Beiser, A., Nguyen, A., Brady, S., Kase, C. & Wolf, P. (2007). Depressive symptoms and risk of stroke: The Framingham Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 38, 16-21.
85. Serrano, M.A., Moya, L. & Salvador, A. (2009). Estrés laboral y salud: Indicadores cardiovasculares y endocrinos. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Anales de psicología*, 1(25), 150-159.
86. Sigurdardottir, V., Fagerberg, B. & Hulthe, J. (2002). Circulating oxidized low-density lipoproteins (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year old man (AIR study). *Journal of internal Medicine*, 252,440-447.
87. Slipak, O. (1994). Estrés y perfiles de personalidad. *Estrés*, 2(2),18-23.

88. Stressgen Biotechnologies. 2008. *Anti-Human Hsp60 (total) ELISA Kit For the detection and quantitation of antibodies to Hsp60 in serum*. Catalog Number: EKS-650.
89. Surtess, P., Wainwright, N., Luben, R., Wareham, N., Bringham, S & Khaw, K. (2008). Psychological distress, major depressive disorder, and risk stroke. *Neurology*, 70(10), 788-94.
90. Valdés, M., Rodríguez, J., Arroyo, M. & Lanzarote, M. (2003). Reactividad al estrés en funcionarios de la administración pública: estudio sobre la estabilidad de respuesta. *Psiquis*, 24(2): 70-79.
91. Velasco, A. (2009). *Metodología de la Investigación en Ciencias Humanas y Sociales. Guía de apoyo general*. [Seminario Doctoral], Universidad de Los Andes. Doctorado en Patología Existencial e Intervención en Crisis, Mérida, Venezuela.
92. Vivar, A. (2009). Ictus, una catástrofe prevenible. *Ictus*, 1(4).
93. Wright, R., Cohen, R. & Cohen, S. (2005). El impacto del estrés en el desarrollo y expresión de atopia. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 5, 23-29.

94. www.geosalud.com/EnfermedadesCardiovasculares/accidentecerebrovascular.htm.
95. www.psicoter.es/test-de-estres
96. www.uam.es/departamentos/medicina/psiquiatria/comunicologia/holmesyrahe.doc
97. Xiao, Q., Mandal, K., Schett. G., Mayr, M., Wick G; Oberhollenzer, F. et al. (2005). Association of serum-soluble Heat Shock Protein 60 with carotid atherosclerosis. *Stroke*,36, 2571-2576.
98. Yépez, J. (2011). Resiliencia, estrés, ansiedad y depresión y su relación con el grupo sanguíneo ABO y la eritrosedimentación globular Tesis de Doctorado para optar al título de Doctor e Patología Existencial e Intervención en Crisis, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
99. Zhu, J. (2001). Antibodies to Human Heat-Shock Protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis. *Circulation*, 103,1071-1075.

ANEXOS.

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TOMA DE MUESTRAS SANGUINEAS PARA EL PROYECTO: *MARCADORES BIOQUIMICOS DE ESTRÉS EN EL ACV: LDL OXIDADA Y ANTI HSP60*

Propósito de la investigación en la que se empleará la muestra de sangre:

En la presente investigación se tratará de determinar la frecuencia con que factores de riesgo no tradicionales como serían los fenómenos psicológicos del individuo tales como **Estrés Psico-social e Índice de Reactividad al Estrés** se presentan como factor predisponente de la enfermedad arteriosclerótica, con consecuencia en ACV isquémico. Se tratará de establecer la frecuencia e intensidad con que dicha enfermedad arteriosclerótica se haya relacionada con otro factor ya estudiado anteriormente en el estrés oxidativo, **LDL oxidada**, conocida como “colesterol inmune”, y en el estrés químico y térmico en células, animales de experimentación y en enfermedades en humanos como el cáncer y recientemente en la arterioesclerosis coronaria como es la proteína de estrés llamada “**Heat Shock Protein**”(HSP) y particularmente un miembro de esta familia de proteínas, la **HSP60** producida en situaciones de “**estrés**” en los diferentes órganos y tejidos. Además le será determinada el perfil lipídico del paciente y sus niveles de glicemia.

Riesgos:

Para obtener el material a analizar es necesario obtener una muestra de sangre (10 mL) que será extraída por el Licenciado en Bioanálisis que realiza esta investigación

No existe ningún riesgo para el paciente o donante sano, adicional al que tiene cualquier extracción rutinaria de sangre.

La muestra será procesada de inmediato y no se utilizará con propósitos diferentes a los señalados.

Confidencialidad:

Los datos personales de los pacientes o donantes sanos serán almacenados separadamente de la muestra procesada y los datos clínicos y bioquímicos. De esta manera se asegura que los resultados que deriven de este estudio solo se compararán con datos clínicos y bioquímicos de pacientes o donantes sanos. En ningún caso se vincularán con la identidad y se mantendrán en absoluto anonimato.

CONSENTIMIENTO

Yo _____ C.I: _____, declaro conocer las normas de esta investigación así como los procedimientos del estudio y doy mi consentimiento para que mi muestra de sangre sea utilizada con los propósitos señalados.

Firma del (la) Paciente

Firma del testigo

Firma del Investigador

Nombre: _____

Nombre: _____

Prof. Norys Rodríguez

C.I: _____

C.I: _____

C.I.:9.584.155

ANEXO 2

FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código Historia N°

DATOS PERSONALES Y SOCIOECONÓMICOS

Nombres y Apellidos

Edad Sexo FN

Dirección

Teléfono e-mail

Profesión

Asegurado IVSS CUAL

Ingreso familiar

DATOS CLÍNICOS

Fecha del ACV

DIABETES HIPERINSULINEMIA

IAM HTA

DISLIPIDEMIAS CUAL

HIPERGLICEMIA CAFÉ

CIGARRILLO ALCOHOL

ENFERMEDAD
CARDIOVASCULAR

ENFERMEDAD Trombótica o tromboembólica

ACTIVIDAD
FÍSICA

SEDENTARIO

MEDICAMENTOS

OTRO DATO

TOMOGRAFIA

Dopler

DATOS DE LABORATORIO

Química

VR

VR

Glicemia

GPT

Urea

LDH

Creatinina

GOT

Colesterol T

TnT

TAG

CK

CKMB

ANEXO 3
ÍNDICE DE REACTIVIDAD AL ESTRÉS

© J.L. González de Rivera

Nombre _____

Código _____

El estrés es una respuesta automática del organismo ante situaciones que exigen mayor esfuerzo de lo ordinario, o en las que puede suceder algo peligroso, nocivo o desagradable. Cada persona tiene una serie de reacciones características ante el estrés, y algunas de las más frecuentes se enumeran en la lista que sigue. Por favor, marque las respuestas que le parecen más próximas a su forma habitual de reaccionar en situaciones de estrés o tensión nerviosa. Puede modificar o añadir algo si lo desea. Gracias por participar en este estudio. Por favor, dirija los cuestionarios así como cualquier comentario o pregunta a:

Prof. J.L. González de Rivera.

Centro de Psicoterapia & Investigación Psicosomática
Avenida de Filipinas, 52
28003 Madrid – Spain

1. Inquietud, incapacidad de relajarme y estar tranquilo.
 - Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente

2. Pérdida de apetito.
 - Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente

3. Desentenderme del problema y pensar en otra cosa.
 - Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente

4. Ganas de suspirar, opresión en el pecho, sensación de ahogo.
 - Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente

5. Palpitaciones, taquicardia.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
6. Sentimientos de depresión y tristeza.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
7. Mayor necesidad de comer, aumento del apetito.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
8. Temblores, tics o calambres musculares.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
9. Aumento de actividad.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
10. Náuseas, mareos, inestabilidad.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
11. Esfuerzo por razonar y mantener la calma.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente

12. Hormigueo o adormecimiento en las manos, cara, etc..

- Nada
- Un poco
- Moderadamente
- Bastante
- Mucho o extremadamente

13. Molestias digestivas, dolor abdominal, etc

- Nada
- Un poco
- Moderadamente
- Bastante
- Mucho o extremadamente

14. Dolores de cabeza.

- Nada
- Un poco
- Moderadamente
- Bastante
- Mucho o extremadamente

15. Entusiasmo, mayor energía o disfrutar con la situación.

- Nada
- Un poco
- Moderadamente
- Bastante
- Mucho o extremadamente

16. Disminución de la actividad.

- Nada
- Un poco
- Moderadamente
- Bastante
- Mucho o extremadamente

17. Pérdida del apetito sexual o dificultades sexuales.

- Nada
- Un poco
- Moderadamente
- Bastante
- Mucho o extremadamente

18. Tendencia a echar la culpa a alguien o a algo.

- Nada
- Un poco
- Moderadamente
- Bastante
- Mucho o extremadamente

19. Somnolencia o mayor necesidad de dormir.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
20. Aprensión, sensación de estar poniéndome enfermo.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
21. Agotamiento o excesiva fatiga.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
22. Urinación frecuente.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
23. Rascarme, morderme las uñas, frotarme, etc..
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
24. Sentimientos de agresividad o aumento de irritabilidad.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
25. Diarrea.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente

26. Beber, fumar o tomar algo (chicle, pastillas, etc.).
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
27. Necesidad de estar solo sin que nadie me moleste.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
28. Aumento del apetito sexual.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
29. Ansiedad, mayor predisposición a miedos, temores, etc.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
30. Tendencia a comprobar repetidamente si todo está en orden.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
31. Mayor dificultad en dormir.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente
32. Necesidad de ser aconsejado y de estar acompañado.
- Nada
 - Un poco
 - Moderadamente
 - Bastante
 - Mucho o extremadamente

ANEXO 4

Nombre _____ Código _____

LA ESCALA DE ESTRÉS PSICOSOCIAL (Holmes y Rahe)

1	Muerte del cónyuge	100
2	Separación o divorcio	70
3	Proceso judicial o problemas legales graves pudiendo terminar en encarcelamiento	68
4	Muerte de un familiar cercano	65
5	Enfermedad o accidente que requiere guardar cama	55
6	Contraer matrimonio	50
7	Quedarse sin trabajo	47
8	Retiro laboral	45
9	Reconciliación con el cónyuge	45
10	Enfermedad de un miembro de la familia o mejoría marcada de una enfermedad crónica en un miembro de la familia	44
11	Rotura de un noviazgo o relación similar	42
12	Embarazo	40
13	Incorporación de un nuevo miembro a la familia	39
14	Muerte de un amigo	38
15	Cambio brusco de las finanzas familiares (en más o en menos)	38
16	Reajuste en la empresa o conflictividad laboral en la empresa en que trabaja	38
17	Cambio en el tipo de actividad laboral	38
18	Empréstito o hipoteca de más de seis mil euros	38
19	La esposa se queda embarazada	35
20	Cambio radical (en más o en menos) en el número de disputas familiares	35
21	Enamorarse o iniciar una nueva amistad íntima y profunda	34
22	El marido o la esposa pierde su empleo	33
23	Mudanza	32
24	Cambio de lugar de trabajo	31
25	Accidente o situación de violencia física	30
26	Un miembro de la familia deja de vivir en la casa familiar	30
27	La esposa comienza a dejar de trabajar fuera de casa	29
28	Peleas o desacuerdos con vecinos o familiares no residentes en la casa familiar (o desaparición de un estado de conflictividad habitual)	28
29	Éxito personal de gran envergadura	28
30	Exámenes	27
31	Promoción en el trabajo	27
32	Peleas o desacuerdos con colegas y compañeros de trabajo (o desaparición de un estado de conflictividad habitual)	26
33	Reformas en la casa (importantes)	25
34	Deterioro notable de la vivienda o del vecindario	25
35	Cambio en las costumbres personales (de salir, vestir, de estilo de vida, etc.)	24

36	Cambio importante en las horas o condiciones de trabajo	23
37	Cambio en las opiniones religiosas	22
38	Cambio en las opiniones políticas	22
39	Modificaciones en la vida social (en más o en menos) aparte de los posibles cambios en las costumbres o hábitos personales	20
40	Cambio en la manera o duración del sueño	18
41	Cambio en la frecuencia de reuniones familiares	17
42	Cambio en las costumbres alimenticias o apetito	16
43	Vacaciones fuera de casa	15
44	Fiestas de Navidad y Reyes o su equivalente	13
45	Problemas legales menores (incluyendo sanciones de tráfico)	11

ANEXO 5



Glicemia enzimática

Método enzimático para la determinación de glucosa en suero o plasma

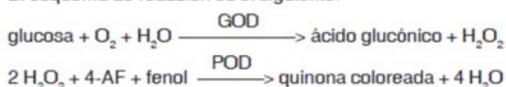
SIGNIFICACION CLINICA

La patología más común relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono es la diabetes mellitus. El diagnóstico precoz y el control de los pacientes diabéticos, tienen por objeto evitar la cetoacidosis y las complicaciones de los síntomas resultantes de la hiperglicemia, mediante el tratamiento adecuado.

Dado que existen múltiples factores causales de hiper o hipoglicemia, debe considerarse en cada caso la condición fisiológica y/o la patología presente en el paciente en cuestión.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema de reacción es el siguiente:



REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en Buffer Tris 0,92 mol/l.

B. Reactivo B: solución de fenol 55 mmol/l.

C. Reactivo C: solución de glucosa oxidasa (1000 U/ml) y peroxidasa (120 U/ml).

S. Standard: solución de glucosa 1 g/l.

Concentraciones finales

GOD	≥ 3000 U/l
POD	≥ 400 U/l
4-AF	1,25 mM
Fenol	2,75 mM
pH	7,4 ± 0,1

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: listo para usar.

Reactivo A: listo para usar.

Reactivo B: listo para usar. Ver PRECAUCIONES.

Reactivo C: homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

Reactivo de Trabajo: de acuerdo al volumen de trabajo, colocar en una probeta 500 partes de agua destilada, 50 partes de Reactivo A, 50 partes de Reactivo B y llevar a 1000 partes con agua destilada. Agregar 3 partes de Reactivo C previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar.

Pueden prepararse distintas cantidades respetando las pro-

porciones antedichas. Es importante además, respetar el orden de agregado de los reactivos y asegurar una perfecta homogeneización de los mismos, a fin de que el Reactivo B no deteriore el Reactivo de Trabajo.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

El Reactivo B (fenol) es tóxico e irritante. R36/38: irrita los ojos y la piel. R25: tóxico por ingestión. S24/25: evitese el contacto con los ojos y la piel. S37/39: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

Reactivo de Trabajo: en refrigerador (2-10°C) y en frasco color caramelo es estable un mes a partir de la fecha de su preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Durante el uso, el Reactivo de Trabajo puede desarrollar un ligero color rosado que no afecta su funcionamiento siempre que se procese un Blanco con cada lote de determinaciones y un Standard periódicamente. Desechar cuando las lecturas del Blanco sean superiores a 0,160 D.O. o las lecturas del Standard sean anormalmente bajas.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: se debe obtener suero o plasma de la manera usual. Cuando no es posible extraer sangre venosa o en casos de extrema urgencia, la determinación se puede realizar en sangre capilar.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda el uso de Anticoagulante G de Wiener lab. para su obtención (el mismo contiene fluoruro como conservador).

c) Sustancias interferentes conocidas: los sueros o plasmas con hemólisis visible o intensa deben ser desproteinizados.

No se observan interferencias por: bilirrubina hasta 200 mg/l, ácido ascórbico hasta 75 mg/l, ácido úrico hasta 200 mg/l,

hemólisis ligera.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: los hematíes y leucocitos son los responsables de la destrucción enzimática de la glucosa sanguínea, siendo máxima a 37°C, razón por la cual debe centrifugarse la sangre dentro de las dos horas posteriores a la extracción, hasta obtener un sobrenadante límpido y transferir a otro tubo para su conservación. En estas condiciones la glucosa es estable 4 horas a temperatura ambiente o 24 horas refrigerada (2-10°C).

En caso de no poder procesarse la muestra de la forma antes indicada, deberá adicionarse un conservador en el momento de la extracción para inhibir la glucólisis.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Material volumétrico adecuado.
- Frasco de vidrio color caramelo.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 10 minutos
- Volumen de muestra: 20 ul
- Volumen de Reactivo de Trabajo: 2 ml
- Volumen final de reacción: 2,02 ml

Los volúmenes de Muestra y de Reactivo pueden variarse proporcionalmente (Ej.: 50 ul de Muestra + 5 ml de Reactivo de Trabajo).

PROCEDIMIENTO			
En tres tubos marcados B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:			
	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Incubar 10 minutos en baño de agua a 37°C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) llevando el aparato a cero con el blanco.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable 1 hora, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{glucosa g/l} = D \times f \quad \text{donde } f = \frac{1,00 \text{ g/l}}{S}$$

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de glicemia, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

Se analizaron con **Glicemia enzimática**, 120 muestras de individuos en ayunas, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 45 años, provenientes de la ciudad de Rosario (Argentina), sin síntomas de diabetes o cualquier otra enfermedad aparente. Se encontró que el 95% de los resultados cubrieron el siguiente rango:

Suero o plasma: 0,70 a 1,10 g/l

En la literatura (Tietz, N.W.) se menciona el siguiente rango de referencia:

Suero o plasma: 0,74 - 1,06 g/l

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia, teniendo en cuenta sexo, edad hábitos alimenticios y otros factores.

CONVERSION DE UNIDADES

Glucosa (g/l) = Glucosa (mg/dl) x 0,01

Glucosa (mg/dl) x 0,0555 = Glucosa (mmol/l)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Los reductores disminuyen la respuesta de color, mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos. Dichos agentes son frecuentemente encontrados en el agua destilada empleada para preparar el Reactivo de Trabajo, por lo que se recomienda controlar la calidad de la misma. Los detergentes, metales pesados y cianuros son inhibidores enzimáticos.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvo lo siguiente:

Nivel	D.S.	C.V.
1,00 g/l	± 0,022 g/l	2,37 %
2,00 g/l	± 0,030 g/l	1,50 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de glucosa a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 99 y 101%.

c) Linealidad: la reacción es lineal hasta 4,5 g/l. Para valores superiores, diluir 1/2 la solución coloreada final con el Reactivo de Trabajo y repetir la lectura multiplicando el resultado final por dos.

d) Exactitud: empleando el método de la hexoquinasa como referencia, se observa que la correlación estadística entre ambos métodos es excelente (r= 0,99).

e) Sensibilidad: el mínimo límite de detección es 0,0054 g/l y la sensibilidad analítica es de 0,042 g/l.

PRESENTACION

- 1000 ml (Cód. 1400101)

BIBLIOGRAFIA

- Henry, R.J.; Cannon, D.C; Winkelman, J. - Clinical Chemistry,

ANEXO 6



Colestat

enzimático

Método enzimático para la determinación de colesterol en suero o plasma

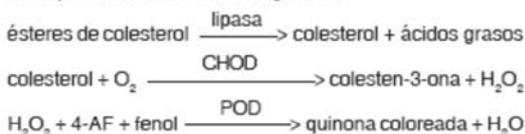
SIGNIFICACION CLINICA

La determinación de colesterol en forma aislada tiene utilidad diagnóstica limitada. Se ha visto que el colesterol es uno de los factores contribuyentes a la formación de ateromas dado que las complicaciones arterioscleróticas prevalecen en individuos hipercolesterolémicos.

Estudios epidemiológicos demuestran que el riesgo de contraer enfermedad cardíaca coronaria para individuos de más de 40 años con colesterolemia menor a 2,10 g/l es 3 veces menor que entre individuos con más de 2,30 g/l y 6 veces menor que entre individuos con más de 2,60 g/l.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema reaccional es el siguiente:



REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l.

B. Reactivo B: solución de fenol 55 mmol/l.

C. Reactivo C: suspensión conteniendo lipasa fungal 300 U/ml, colesterol oxidasa (CHOD) 3 U/ml y peroxidasa (POD) 20 U/ml.

S. Standard: solución de colesterol 2 g/l.

Concentraciones finales

Lipasa	≥ 6000 U/l
CHOD	≥ 60 U/l
POD	≥ 400 U/l
4-AF	1,25 mmol/l
Fenol	2,75 mmol/l
pH	7,4 ± 0,1 (a t° amb.)

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: mezclar por inversión antes de usar.

Reactivo A: listo para usar.

Reactivo B: listo para usar. Ver PRECAUCIONES.

Reactivo C: homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

Reactivo de Trabajo: según el volumen de trabajo colocar en una probeta 50 partes de agua destilada, 5 partes de Reactivo A, 5 partes de Reactivo B y llevar a 100 partes con agua destilada. Agregar 2 partes de Reactivo C previamente homo-

geneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar.

Pueden prepararse distintas cantidades respetando las proporciones establecidas. Es importante además, respetar el orden de agregado de los reactivos y asegurar una perfecta homogeneización de los mismos, a fin de que el Reactivo B no deteriore el Reactivo de Trabajo.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

El Reactivo B (fenol) es tóxico e irritante. R36/38: irrita los ojos y la piel. R25: tóxico por ingestión. S24/25: evítese el contacto con los ojos y la piel. S37/39: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

Reactivo de Trabajo: en refrigerador y en frasco de vidrio color caramelo es estable 1 mes a partir del momento de su preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Durante el uso, el Reactivo de Trabajo puede desarrollar un ligero color rosado que no afecta los resultados siempre que se procese un Blanco con cada lote de determinaciones y un Standard periódicamente. Desechar cuando las lecturas del Blanco sean superiores a 0,160 D.O. o las lecturas del Standard sean anormalmente bajas.

MUESTRA

Suero o plasma

a) **Recolección:** se debe obtener suero o plasma de la manera usual.

b) **Aditivos:** en caso de que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda únicamente el uso de heparina como anticoagulante para su obtención.

c) **Sustancias interferentes conocidas:**

- Excepto la heparina, los anticoagulantes comunes interfieren en la determinación.

- Los sueros con hemólisis visible o intensa producen valores

falsamente aumentados por lo que no deben ser usados.
 - En sueros fuertemente hiperlipémicos puede observarse turbiedad: en tal caso, diluir el volumen final de reacción a 1/2 ó 1/3 con Blanco de reactivos, repetir la lectura y multiplicar el resultado por el factor de dilución.
 - No interfieren: bilirrubina hasta 200 mg/l, ácido ascórbico hasta 75 mg/l, ácido úrico hasta 200 mg/l, ni hemólisis ligera.
 Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el colesterol en suero es estable 1 semana en refrigerador (2-10°C) y 2 meses congelado, sin agregado de conservadores.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas, pipetas y material volumétrico adecuados.
- Frasco de vidrio color caramelo.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C (opcional).
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
 - Temperatura de reacción: 37°C
 - Tiempo de reacción: 15 minutos
 - Volumen de muestra: 20 ul
 - Volumen de Reactivo de Trabajo: 2 ml
 - Volumen final de reacción: 2,02 ml
- Los volúmenes de Muestra y Reactivo pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente (Ej.: 10 ul de Muestra + 1 ml de Reactivo de Trabajo o 50 ul + 5 ml).

PROCEDIMIENTO

En tres tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Incubar 15 minutos en baño de agua a 37°C o 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Leer en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) o en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero con el Blanco.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable dos horas, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{colesterol (g/l)} = D \times f \quad \text{donde } f = \frac{2,00 \text{ g/l}}{S}$$

CONVERSION DE UNIDADES

$$\begin{aligned} \text{colesterol (g/l)} &= \text{colesterol (mg/dl)} \times 0,01 \\ \text{colesterol (mmol/l)} &= \text{colesterol (g/l)} \times 2,59 \\ \text{colesterol (g/l)} &= \text{colesterol (mmol/l)} \times 0,39 \end{aligned}$$

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (Standatrol S-E 2 niveles) con concentraciones conocidas de colesterol, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de colesterol:

Deseable: < 2,00 g/l
 Moderadamente alto: 2,00 - 2,39 g/l
 Elevado: ≥ 2,40 g/l

No obstante, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos o valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Otras causas de resultados erróneos son:

- Los reductores disminuyen la respuesta de color mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos. Dichos agentes son frecuentemente encontrados en el agua destilada empleada para preparar el Reactivo de Trabajo, por lo que se recomienda controlar la calidad de la misma.
- Los detergentes, metales pesados y cianuros son inhibidores enzimáticos.
- Incubación incorrecta. El nivel del agua en el baño no debe ser inferior al de los reactivos en los tubos.
- Uso del Standard de un equipo con los reactivos de otro. Los reactivos y el Standard de cada equipo forman un conjunto perfectamente controlado y estandarizado.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvo:

Nivel	D.S.	C.V.
1,57 g/l	± 0,033 g/l	2,32 %
2,90 g/l	± 0,065 g/l	2,23 %
4,71 g/l	± 0,102 g/l	2,13 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de colesterol a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 98 y 101%, para todo nivel de colesterol entre 1,90 y 4,79 g/l.

c) Límite de detección: depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. De acuerdo con la sensibilidad requerida, el cambio mínimo de concentración detectable para 0,001 D.O. será aproximadamente de 0,007 g/l.

d) Linealidad: la reacción es lineal hasta 5 g/l. Para valores superiores, diluir 1/2 con el Blanco y repetir la lectura multiplicando el resultado final por 2.

PRESENTACION

- 250 ml (Cód. 1220101)
- 1000 ml (Cód. 1220102)

ANEXO 7



HDL Colesterol

FT

Reactivo precipitante (ácido fosfotúngstico) para la separación de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL) en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas que contienen cantidades variables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas.

Los fosfolípidos, el colesterol libre y las proteínas constituyen la superficie externa de la partícula lipoproteica, mientras que su core contiene en mayor proporción colesterol esterificado y triglicéridos.

Estas partículas solubilizan y transportan el colesterol en el torrente sanguíneo.

La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas y proveen las bases sobre las cuales establecer una clasificación. Estas clases son: quilomicrones, proteínas de muy baja densidad (VLDL), proteínas de baja densidad (LDL) y proteínas de alta densidad (HDL).

Numerosos estudios clínicos han demostrado que las diferentes clases de lipoproteínas tienen distintos y variados efectos en el riesgo de enfermedad coronaria.

La función principal de las HDL en el metabolismo lipídico es la captación y transporte de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado en un proceso conocido como transporte reverso de colesterol (mecanismo cardioprotectivo).

El HDL colesterol bajo, está asociado con un alto riesgo de enfermedad cardíaca. Por este motivo la determinación de HDL colesterol es una herramienta útil en la identificación de individuos de alto riesgo.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se separan precipitando selectivamente las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) mediante el agregado de ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio.

Las HDL quedan en el sobrenadante separado por centrifugación, donde se realiza la determinación del colesterol ligado a las mismas, empleando el sistema enzimático Colesterol oxidasa/Peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol/4-AF).

REACTIVOS PROVISTOS

Reactivo Precipitante: solución de ácido fosfotúngstico 0,44 mmol/l y cloruro de magnesio 20 mmol/l.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Colestat enzimático o **Colestat enzimático AA/líquida**, provistos separadamente por Wiener Lab.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

El **Reactivo Precipitante** se provee listo para su uso.

PRECAUCIONES

El reactivo es para uso diagnóstico "in vitro".

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El Reactivo Provisto es estable a temperatura ambiente (< 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cualquier indicio de contaminación bacteriana puede ser signo de deterioro de los reactivos.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener la muestra de la manera habitual.

b) Aditivos: en caso de utilizar plasma, recogerlo únicamente con heparina.

c) Sustancias interferentes conocidas: anticoagulantes distintos de la heparina y bilirrubinemia mayor de 50 mg/l son causas de interferencia.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: separar el suero dentro de la hora de la extracción. Las Lipid Research Clinics recomiendan refrigerar la muestra hasta la realización del ensayo. La conservación de las muestras a temperatura ambiente altera la composición lipoproteica de las muestras aún antes de las 24 horas. Algunos autores mencionan estabilidad de 3 días a 4°C que se prolongan al congelar, pero existe mucha variabilidad entre muestras diferentes, por lo que se recomienda mantener la muestra refrigerada y procesar dentro de las 24 horas.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas capaces de medir los volúmenes indicados.
- Tubos de Kahn.
- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 35 minutos

- Volumen de muestra: 200 ul
- Volumen de Reactivo Precipitante: 500 ul
- Volumen de Sobrenadante: 200 ul
- Volumen de Reactivo de Trabajo de Colestat enzimático o Colestat enzimático AA/líquida: 2 ml
- Volumen final de reacción: 2,2 ml

PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn medir 200 ul de muestra, y agregar 500 ul de Reactivo Precipitante. Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar 10 minutos en reposo a temperatura ambiente. Centrifugar 15 minutos a 3.000 r.p.m. o 2 minutos a 12.000 r.p.m. Usar el sobrenadante límpido como muestra. En tres tubos de fotocolorímetro marcados B, S y D, colocar:

	B	S	D
Sobrenadante	-	-	200 ul
Standard	-	20 ul	-
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C si se usa el Reactivo de Trabajo de **Colestat enzimático AA/líquida** o 15 minutos a 37°C cuando se usa el de **Colestat enzimático**. Retirar del baño y enfriar. Leer a 505 nm en espectrofotómetro o en colorímetro con filtro verde (490-530 nm), llevando a cero con el Blanco.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción es estable 2 horas por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{HDL Colesterol (g/l)} = D \times f \quad f = \frac{0,762}{S}$$

$$0,762 = 2 \text{ g/l} \times \frac{V_{F_E}}{V_M} \times \frac{V_{R_E}}{V_{R_S}} \times \frac{V_S}{V_E}$$

donde:

V_{F_E} = volumen final de extracto = 0,7 ml

V_M = volumen de muestra procesada = 0,2 ml

V_{R_E} = volumen de reacción con extracto = 2,2 ml

V_{R_S} = volumen de reacción con Standard = 2,02 ml

V_S = volumen de Standard en la reacción = 0,020 ml

V_E = volumen de extracto en la reacción = 0,2 ml

Si se emplean volúmenes de Reactivo diferentes de 2 ml el factor 0,762 varía y debe ser calculado nuevamente, reemplazando en la fórmula V_{R_E} y V_{R_S} .

VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de HDL colesterol:

0,40 - 0,60 g/l

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. No obstante, valores mayores de 0,40 g/l se consideran recomendables y los que se encuentren por encima de 0,60 g/l se han considerado como protectivos. Por el contrario, valores de HDL colesterol por debajo de 0,40 g/l se consideran como índice significativo de riesgo de enfermedad cardíaca coronaria.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
- La exactitud y precisión dependen fundamentalmente de la observación de las condiciones de precipitación.
- Muestras con trigliceridemia superior a 10 g/l pueden dificultar la precipitación fraccionada dando lugar a sobrenadantes turbios o a una capa de lipoproteínas que flotan sobre la superficie. En tal caso, diluir la muestra al 1/2 con solución fisiológica y repetir la precipitación. El resultado obtenido deberá multiplicarse por 2.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de una misma muestra en el día se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
0,32 g/l	± 0,011 g/l	3,4 %
0,68 g/l	± 0,024 g/l	3,5 %

b) Linealidad: la reacción es lineal hasta 5 g/l.

PRESENTACION

Equipo para procesar 200 muestras (Cód. 1220108).

Wiener lab. provee además:

- **Colestat enzimático**
- 250 ml de Reactivo de Trabajo
- 1000 ml de Reactivo de Trabajo
- **Colestat enzimático AA**
- 1 x 100 ml
- 4 x 100 ml
- **Colestat enzimático AA líquida**
- 6 x 60 ml
- 4 x 100 ml
- 2 x 500 ml

BIBLIOGRAFIA

- Castelli, W.; Levitas I. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Gordon, T. - Am. J. Med. 62:707 (1977).
- Lopes-Virela, M.F. et al. - Clin. Chem. 23/5:882 (1977).
- Coniglio, R. I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Cooper, C. - National Heart and Lung Institute, NIH (USA), 1974.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

Elaborado por:
Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Inscripción M.S.
Disp. N°: 884/96 - 371/00
Cert. N°: 1344/96



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina

ANEXO 8



LDL Colesterol

monofase AA

Para la determinación de LDL colesterol en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas que contienen cantidades variables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas. Estas partículas solubilizan y transportan el colesterol en el torrente sanguíneo.

La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas y provee las bases sobre las cuales establecer una clasificación. Estas clases son: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL - Very Low Density Lipoproteins), lipoproteínas de baja densidad (LDL - Low Density Lipoproteins) y lipoproteínas de alta densidad (HDL - High Density Lipoproteins). Numerosos estudios clínicos han demostrado que las diferentes clases de lipoproteínas tienen distintos y variados efectos en el riesgo de enfermedad coronaria. Estos estudios señalan al LDL colesterol como el factor clave en la patogénesis de la aterosclerosis y la enfermedad cardíaca coronaria (ECC), mientras que el HDL colesterol es considerado como factor protector. Puede ocurrir un aumento en el LDL colesterol, aún con concentraciones normales de colesterol, asociado a un incremento en el riesgo de ECC.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El presente método es un ensayo homogéneo sin precipitación, en dos pasos. En el primero, se agrega un tensioactivo (Reactivo A) que solubiliza las partículas lipoproteicas no-LDL. El colesterol liberado es consumido por la colesteroles esterasa y la colesteroles oxidasa en una reacción sin desarrollo de color. Un segundo tensioactivo (Reactivo B) solubiliza las partículas de LDL formándose, por la presencia de enzimas y un Reactivo cromogénico, un color proporcional a la cantidad de LDL colesterol presente en la muestra.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución conteniendo colesteroles esterasa 1000 U/l, colesteroles oxidasa 1200 U/l, peroxidasa 1250 U/l, ascorbato oxidasa 3000 U/l, 4-aminoantipirina 1 g/l y tensioactivo 7 g/l en buffer MES 50 mM.

B. Reactivo B: solución conteniendo N,N-bis-(4-sulfobutil)-m-toluidina disódica (DSBmT) 0,4 g/l y tensioactivo 10 g/l en buffer MES 50 mM.

Calibrador*: suero humano liofilizado conteniendo lipoproteínas de diversos tipos incluyendo LDL. La concentración es variable lote a lote (ver título en el rótulo).

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos A y B: listos para usar.

Calibrador: reconstituir con el volumen de agua destilada indicado en el rótulo. Cerrar el vial y dejar 5 minutos. Luego

disolver el contenido del vial por agitación suave evitando la formación de espuma.

PRECAUCIONES

- Los Reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- No pipetear con la boca.
- El Calibrador ha sido examinado para HBsAg, HCV y anticuerpo contra HIV 1/2, encontrándose no Reactivo. No obstante debe procesarse como si se tratara de material infeccioso.
- Utilizar los Reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.
- Todos los Reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los Reactivos Provistos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar. Una vez abierto los Reactivos son estables durante 4 semanas en refrigerador (2-10°C).

Calibrador: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. Una vez reconstituido es estable 2 semanas en refrigerador (2-10°C). Puede fraccionarse en alícuotas debiendo ser conservado a -80°C.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener la muestra de la manera usual.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma usar EDTA o heparina como anticoagulantes.

c) Sustancias interferentes conocidas: no se encuentran interferencias por ácido ascórbico hasta 50 mg/dl, hemoglobina hasta 500 mg/dl, bilirrubina hasta 20 mg/dl y γ -globulina hasta 50 g/l. En caso de muestras con concentraciones superiores de interferentes, deberán diluirse con solución fisiológica antes de proceder a su ensayo, multiplicando el resultado obtenido por la dilución efectuada.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: centrifugar y separar el suero del coágulo dentro de las 3 horas posteriores a la extracción. De no procesar las muestras inmediatamente, las mismas pueden ser conservadas durante 5 días en refrigerador (2-10°C).

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Material volumétrico para medir los volúmenes indicados.
- Analizador automático.

PROCEDIMIENTO

(analizadores automáticos)

A continuación se detalla un procedimiento general para **LDL Colesterol monofase AA** en un analizador automático. Cuando se implemente la técnica para un analizador en particular seguir las instrucciones de trabajo del mismo.

Muestra o Calibrador	3 ul
-----------------------------	------

Reactivo A	300 ul
-------------------	--------

Incubación durante 5 minutos a 37°C. Lectura de absorbancia a 660/546 nm (Blanco de Muestra).

Reactivo B	100 ul
-------------------	--------

Incubación durante 5 minutos a 37°C. Lectura del resultado a 660/546 nm (concentración de LDL-colesterol).

CALIBRACION

El Calibrador debe procesarse junto con las muestras y en la misma forma que éstas. Las concentraciones del Calibrador se encuentran alrededor de los niveles de decisión médica y son variables lote a lote (ver título en el rótulo). Ingresar el valor de concentración del calibrador cada vez que se cambie de lote.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

LDL colesterol (mmol/l) = LDL colesterol (mg/dl) x 0,02586

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de LDL colesterol, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de LDL colesterol en relación al riesgo de contraer enfermedad cardíaca coronaria (ECC):

- **Riesgo bajo o nulo** (sujetos normales): valores de LDL colesterol menores de 129 mg/dl.
- **Riesgo moderado a elevado** (individuos con probabilidad de contraer ECC): valores entre 130 y 189 mg/dl.
- **Riesgo muy elevado** (individuos sospechosos de padecer ECC): valores de LDL colesterol \geq 190 mg/dl.

No obstante, es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

No deben emplearse anticoagulantes que contengan citrato.

PERFORMANCE

a) Exactitud: la exactitud del método descrito se verificó por comparación con los valores obtenidos por el método de referencia de ultracentrifugación y análisis del colesterol y con el método directo de inmunoseparación de LDL.

Los resultados de la comparación fueron los siguientes:

Método	LDL Colesterol monofase AA	Referencia
Nº de muestras	54	54
promedio (mg/dl)	122,5	125,1
desvio standard (mg/dl)	30,7	30,9
coeficiente de correlación: 0,96		

Método	LDL Colesterol monofase AA	Método directo
Nº de muestras	92	92
promedio (mg/dl)	120,0	122,8
desvio standard (mg/dl)	30,5	31,6
coeficiente de correlación: 0,97		

b) Precisión: procesando simultáneamente 20 muestras en el mismo día se obtuvo la siguiente variación intraensayo:

Nivel	D.S.	C.V.
98,1 mg/dl	\pm 0,72 mg/dl	0,73 %
146,5 mg/dl	\pm 0,96 mg/dl	0,66 %
209,8 mg/dl	\pm 1,31 mg/dl	0,62 %

c) Limite de detección: 0,278 mg/dl.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso.

PRESENTACION

- 80 ml (1 x 60 ml + 1 x 20 ml) (Cód. 1220220)

- 80 ml (2 x 30 ml + 2 x 10 ml) (Cód. 1009283)

BIBLIOGRAFIA

- Crouse, J.R. et al. - J- Lipid Res. 26: 566, 1985.
- Barr, D.P.; Russ, E.M.; Eder, H.A. - Am. J. Med. 11:480, 1951.
- William, P. Robinson, D.; Baily, A. - Lancet 1:72, 1979.
- Kannel, W.B.; et al. - Am. Intern. Med. 90/1:85, 1979.
- Bachorik, P.S.; et al. - Clin. Chem. 41/10, 1995.
- Grundy, S.M. et al. - JAMA 269/23:3015, 1993.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACCC Press, 4ª ed., 2001.
- Tietz, N.W. - W.B. Saunders Co., Philadelphia, p.256, 1986.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).

ANEXO 9



C

TG Color

GPO/PAP AA

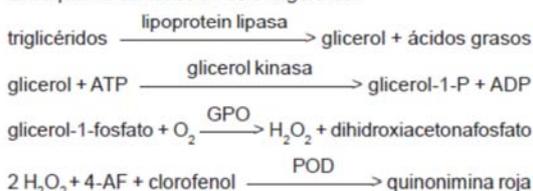
Método enzimático para la determinación de triglicéridos en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

Los triglicéridos son lípidos absorbidos en la dieta y también producidos en forma endógena a partir de los carbohidratos. Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipidemias. Estas enfermedades pueden tener origen genético o ser secundarias a otras tales como nefrosis, diabetes mellitus y disfunciones endócrinas. El aumento de triglicéridos se ha identificado como un factor de riesgo en enfermedades ateroscleróticas.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema de reacción es el siguiente:



REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: viales conteniendo lipoprotein lipasa, glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), peroxidasa (POD), adenosina trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona (4-AF).

B. Reactivo B: solución de buffer Good conteniendo clorofenol, pH 7,5.

S. Standard: solución de glicerol 2,26 mmol/l (equivale a 2 g/l de trioleína).

Concentraciones finales

Good	50 mmol/l; pH 7,5
clorofenol	2 mmol/l
lipoprotein lipasa	≥ 800 U/l
GK	≥ 500 U/l
GPO	≥ 1500 U/l
POD	≥ 900 U/l
ATP	2 mmol/l
4-AF	0,4 mmol/l

REACTIVOS NO PROVISTOS

Calibrador A plus de Wiener lab. cuando se emplea la técnica automática.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: listo para usar.

Reactivo de Trabajo:

- 5/10 x 20 ml: agregar 20 ml de Reactivo B a un vial de Reactivo A. Mezclar hasta disolución completa. Homogeneizar y fechar.

- 4 x 50 ml: reconstituir el contenido de un vial de Reactivo A con una porción de Reactivo B y luego transferir al frasco de Reactivo B enjuagando varias veces. Homogeneizar y fechar.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

Reactivo de Trabajo: es estable 30 días en refrigerador (2-10°C).

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

El Reactivo de Trabajo puede presentar una coloración rosada que no afecta su funcionamiento.

Lecturas del Blanco superiores a 0,160 D.O. o lecturas del Standard anormalmente bajas, son indicios de deterioro del Reactivo. En tal caso, desechar.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: previo ayuno de 12 a 14 horas, obtener suero o plasma. Separar de los glóbulos rojos dentro de las 2 horas de extracción.

b) Aditivos: en caso de emplear plasma, se recomienda el uso de Anticoagulante W o heparina para su obtención.

c) Sustancias interferentes conocidas: los sueros con hemólisis intensa o marcadamente ictericos producen resultados erróneos, por lo que no deben ser usados.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: los triglicéridos en suero son estables 3 días en refrigerador (2-10°C). No congelar.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.

- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.

- Tubos o cubetas espectrofotométricas.

- Baño de agua a 37°C.

- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o 490-530 nm en fotocolorímetro con filtro verde.
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen de reactivo: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

PROCEDIMIENTO

Homogeneizar la muestra antes de usar, especialmente frente a sueros lechosos.
En tres tubos o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Muestra	-	-	10 ul
Standard	-	10 ul	-
Reactivo de Trabajo	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar, incubar 5 minutos a 37°C o 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Enfriar y leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) llevando el aparato a cero con agua destilada.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable 60 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Corregir las lecturas con el Blanco de reactivos y usar las lecturas corregidas para los cálculos.

$$TG \text{ g/l} = D \times \text{factor} \quad \text{factor} = \frac{2 \text{ g/l}}{S}$$

CONVERSION DE UNIDADES

Triglicéridos (g/l) = 0,01 x Triglicéridos (mg/dl)
Triglicéridos (mg/dl) x 0,0113 = Triglicéridos (mmol/l)

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standardrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de triglicéridos, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de Triglicéridos:

Deseable: < 1,50 g/l
Moderadamente elevado a elevado: 1,50 - 1,99 g/l
Elevado: 2,00 - 4,99 g/l
Muy elevado: ≥ 5,00 g/l

No obstante, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos o valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
Los reductores disminuyen la respuesta de color, mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos.
Las contaminaciones con glicerol producen resultados falsamente aumentados.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando simultáneamente replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.S.	C.V.
1,14 g/l	± 0,021 g/l	1,82 %
7,41 g/l	± 0,074 g/l	2,11 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de trioleína a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 99,2 y 100,7% para todo el rango de linealidad del método.

c) Linealidad: la reacción es lineal hasta 10 g/l de triglicéridos. Para valores superiores, repetir la determinación con muestra diluida 1:2 con solución fisiológica. Multiplicar el resultado obtenido por la dilución efectuada.

d) Limite de detección: depende del fotómetro empleado. En espectrofotómetros, el cambio mínimo de concentración detectable en las condiciones de reacción descriptas, para una variación de absorbancia de 0,001 D.O. será aproximadamente de 0,008 g/l.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación debe consultarse el Manual del Usuario del Analizador en uso.
Para la calibración debe emplearse **Calibrador A plus** de Wiener lab., de acuerdo a los requerimientos del analizador.

PRESENTACION

- 5 x 20 ml (Cód. 1780107).
- 10 x 20 ml (Cód. 1780101).
- 4 x 50 ml (Cód. 1780105).

BIBLIOGRAFIA

- Fossati, P - Clin. Chem. 28/10:2077 (1982).
- McGowan, M.W.; et al - Clin. Chem. 29/3: 538 (1983).
- Tietz, N.W. - Fundamentals of Clin. Chem. - W.B., Saunders Co. - Philadelphia, Pa. (1970), pág. 329.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

ANEXO 10

SIEMENS

Dimension® clinical chemistry system

Flex® reagent cartridge

Consulte las secciones sombreadas; Información actualizada desde la versión de 2004-01.

REF DF40

GLUC

Fecha de la edición 2008-02-29

Glucosa

Uso previsto: El método GLUC utilizado en el sistema de química clínica Dimension® es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de la glucosa en el líquido cefalorraquídeo, orina, plasma y suero humano.

Resumen: El método de glucosa (GLUC) es una adaptación del método hexoquinasa-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, presentado como un método de laboratorio clínico general descrito por Katat, y cols.¹ El método de hexoquinasa es el método de referencia generalmente aceptado para medir el nivel de glucosa.^{2,3} Las mediciones de los niveles de glucosa se utilizan en el diagnóstico y el tratamiento de los trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono como diabetes mellitus, hipoglucemia neonatal e insulinoma.⁴

Principios del procedimiento: La hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de glucosa en presencia de adenosina-5'-trifosfato (ATP) y magnesio para formar glucosa-6-fosfato (G-6-P) y adenosin difosfato (ADP). G-6-P se oxida mediante la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) para producir 6-fostogluconato and NADH. Un mol de NADH se convierte en un mol de NADH por cada mol de glucosa presente. La absorbancia debida al NADH (y por tanto la concentración de glucosa) se determina mediante la técnica de punto final bicromática (340 y 363 nm).

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucosa-6-fosfato} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-fostogluconato} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Reactivos

Pocillos*	Forma	Ingrediente	Concentración
1 - 6	Líquido	HK	15 U/mL
		G-6-PDH	30 U/mL
		NAD	8 mmol/L
		ATP	15 mmol/L
		Mg ²⁺	7.4 mmol/L
		Estabilizador	
		Tampón	

a. Los pocillos están numerados consecutivamente desde el extremo ancho del cartucho.

Precauciones: Contiene azida de sodio (< 0.1%) como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con tuberías de cobre o de plomo en los conductos de drenaje y formar compuestos explosivos. Elimine este producto de forma apropiada conforme a la normativa local.

Las cubetas usadas contienen fluidos corporales de origen humano; manipular con el cuidado apropiado para evitar el contacto con la piel o la ingestión.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Preparación del reactivo: Todos los reactivos son líquidos y están listos para su uso.

Conservar a: 2 - 8 °C

Caducidad: Consulte en el envase la fecha de caducidad de los cartuchos de reactivos individuales sin abrir. Los pocillos sellados del cartucho en el instrumento son estables durante 42 días.

Estabilidad de los pocillos abiertos: 7 días para los pocillos 1 - 6

Recogida de muestras y manipulación: Para recoger y almacenar las muestras de suero, plasma, orina y líquido cefalorraquídeo que se desea analizar con este método se pueden seguir los procedimientos normales.⁴ La heparina de sodio, heparina de litio, EDTA y oxalato de potasio no interfieren con el método GLUC.

Siga las instrucciones de uso y procesamiento suministradas con el dispositivo de recogida de muestras.⁵

Las muestras deben estar libres de partículas. Con el fin de evitar la aparición de fibrina en las muestras de suero, debe ocurrir una completa formación del coágulo antes de la centrifugación. El tiempo de coagulación puede incrementarse debido a una terapia anticoagulante o trombolítica.

La glicólisis disminuye la glucosa sérica del 5% al 7% por hora aproximadamente en sangre coagulada sin centrifugar normal a temperatura ambiente.⁶ En suero estéril no hemolizado, separado, la concentración de glucosa se mantiene normalmente estable durante 8 horas a 25 °C y hasta 72 horas a 4 °C, mientras que en condiciones de almacenamiento más largo se observa estabilidad variable.⁷ Es posible inhibir la glicólisis y estabilizar la glucosa durante 3 días a temperatura ambiente mediante la adición de yodoacetato de sodio o fluoruro de sodio (NaF) a la muestra.⁸

No se observaron diferencias clínicamente significativas entre las muestras de suero y plasma.

Plasma de heparina de sodio frente a suero: $n = 57, y = 0.99x + 2.45, r = 0.999$

Plasma de heparina de litio frente a suero: $n = 57, y = 0.99x + 2.95, r = 0.999$

Plasma de heparina de fluoruro frente a suero: $n = 57, y = 1.00x + 1.96, r = 0.999$

Procedimiento

Materiales suministrados

Cartucho de reactivos Flex® de GLUC ref. DF40

Materiales necesarios pero no suministrados

Calibrador CHEM 1, ref. DC18A o DC188
Materiales de control de calidad

Proceso del análisis

El sistema Dimension® realiza de manera automática el muestreo,⁹ la dispensación de reactivos, la mezcla, el procesamiento y la impresión de resultados. Para más detalles sobre este proceso, consulte el Manual del usuario del sistema Dimension®.

b. El recipiente de la muestra (si no se trata de un tubo principal) debe tener la cantidad suficiente para contener el volumen de muestra necesario más el volumen muerto.

Condiciones del análisis

Volumen de muestra: 3 µL
Volumen del reactivo 1: 56 µL
Volumen de diluyente: 321 µL
Temperatura: 37 °C
Longitud de onda: 340 nm y 363 nm
Tipo de medición: Bicromática de punto final

Calibración

Intervalo del ensayo: 0 - 500 mg/dL [0 - 27.8 mmol/L]
Material de calibración: Calibrador CHEM 1, ref. DC18A o DC188
Esquema de calibración: 3 niveles, n = 3
Unidades: mg/dL [mmol/L]
(mg/dL x 0.055) = (mmol/L)

Niveles habituales de calibración: 0, 250, 500 mg/dL
[0, 13.9, 30.5 mmol/L]

Frecuencia de calibración: Cada 90 días para cualquier lote

Si requiere una nueva calibración: Para cada lote nuevo de cartuchos de reactivos Flex®

- Después de la realización de importantes tareas de mantenimiento o servicio, si los resultados de control de calidad así lo indican.
- Tal como se indica en los procedimientos de control de calidad del laboratorio.
- Cuando es obligatorio según las representaciones gubernamentales.

Coefficientes asignados: C₁: 0.000
C₂: 0.080

c. Las unidades del Sistema Internacional de Unidades [unidades SI] se indican entre corchetes.

Control de calidad

Al menos una vez por día de uso, analice diez pocillos de un reactivo de control de calidad (CC) con concentraciones conocidas de glucosa. Siga los procedimientos internos de CC de su laboratorio si los resultados obtenidos no se encuentran dentro de los límites aceptables.

Resultados: El instrumento calcula e imprime automáticamente la concentración de glucosa en mg/dL [mmol/L] según el esquema de cálculo ilustrado en el Manual del usuario del sistema Dimension®.

Los resultados de esta prueba deberán interpretarse siempre de acuerdo con la historia clínica del paciente, la sintomatología clínica y otras observaciones.

Rango de medición analítico (AMR): 0 - 500 mg/dL [0 - 27.8 mmol/L]. Se trata del rango de valores del análisis que puede medirse directamente a partir de la muestra sin requerir dilución ni tratamiento previo que no sea parte del proceso analítico habitual y es equivalente al intervalo del ensayo.

Las muestras con resultados que superen los 500 mg/dL [27.8 mmol/L] deben repetirse con dilución.

Dilución manual: Realice la dilución apropiada con agua de grado reactivo para obtener un resultado que esté dentro del intervalo del ensayo. Introduzca el factor de dilución. Repita el análisis. La lectura resultante se corregirá en función de la dilución.

Autodilución (AD): Si se utiliza la función de autodilución, los resultados que excedan 500 mg/dL [27.8 mmol/L] (suero/plasma/orina) se repetirán automáticamente. El volumen de autodilución es 2 µL. Para obtener información adicional sobre la función de autodilución, consulte el Manual del usuario del sistema Dimension®.

Limitaciones del procedimiento

El sistema de informes del instrumento contiene mensajes de error para avisar al usuario acerca de fallos específicos de funcionamiento. Cualquier informe con dichos mensajes de error debe ser conservado para seguimiento. Consulte el Manual del sistema Dimension®.

Es posible que el sistema no funcione correctamente si se obtiene la siguiente precisión en cinco pruebas consecutivas:

Concentración	DE
78 mg/dL [4.3 mmol/L]	> 4.7 mg/dL [0.3 mmol/L]
264 mg/dL [14.6 mmol/L]	> 12.0 mg/dL [0.7 mmol/L]

Sustancias que causan interferencia

La hemoglobina (hemolizada) en 1000 mg/dL [0.62 mmol/L] disminuye un resultado de GLUC a 50 mg/dL [2.8 mmol/L] en un 11%.

La bilirrubina (no conjugada) en 60 mg/dL [1026 mmol/L] disminuye un resultado de GLUC a 50 mg/dL [2.8 mmol/L] en un 13%.

La lipemia (intralipid[®]) a 200 mg/dL [2.29 mmol/L] aumenta un resultado de GLUC a 50 mg/dL [2.8 mmol/L] en un 10%.

La concentración de yoduro de povidona (PAM) de 512 µg/mL [1.93 mmol/L] aumenta un resultado de GLUC de 78 mg/dL [4.3 mmol/L] en un 17%.

ANEXO 11

REF DF27

DADE BEHRING

Dimension® clinical chemistry system

Flex® reagent cartridge

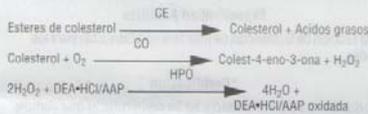
CHOL

Cartucho de Reactivos Flex® de Colesterol

Uso: El método CHOL empleado por el sistema de química clínica Dimension® es un análisis de diagnóstico *in vitro* que tiene por objeto la determinación cuantitativa de colesterol en suero y plasma.

Resumen: El método CHOL se basa en el principio primeramente descrito por Stadtman¹ y luego adaptado por otros analistas^{2,3} incluyendo Rautela y Liedtke.⁴

Principios del Procedimiento: La colesteroil esterasa (CE) cataliza la hidrólisis de los ésteres de colesterol para producir colesterol libre que, junto con el colesterol preexistente, es oxidado en una reacción catalizada por la colesteroil oxidasa (CO) para formar colest-4-eno-3-ona y peróxido de hidrógeno. En la presencia de peroxidasa de rábano (HPO), el peróxido de hidrógeno así formado es empleado para oxidar la N,N-dietilililina-HCl/4-aminoantipirina (DEA-HCl/AAP) para producir un cromóforo que absorbe a 540 nm. La absorbancia debido a la DEA-HCl/AAP oxidada es directamente proporcional a la concentración de colesterol total y es medida utilizando una técnica policromática de punto final (452, 540, 700 nm).



Reactivos

Pocillos ^a	Forma	Ingrediente	Concentración ^b	Origen
1-3	Tableta ^c	CE	0.7 U/mL	Hongos
		CO	0.1 U/mL	Microbial
		HPO	2.4 U/mL	Plantas
1-3	Tableta ^c	AAP	4.5 µmol	
		Tampón		
		Colato		
4-6	Líquido	DEA	5.8 µmol	
		Surfactante		

a. Los pocillos están numerados consecutivamente a partir del extremo ancho del cartucho.

b. Valor nominal por análisis a su fabricación.

c. Las tabletas contienen excipientes.

Precauciones: Las cubetas usadas contienen fluidos orgánicos humanos; manejar con el cuidado apropiado para evitar el contacto con la piel o la ingestión.⁵

Para uso diagnóstico *in vitro*

Preparación del Reactivo: La mezcla y la dilución son efectuadas automáticamente por el instrumento.

Conservación: Guardar a 2 – 8 °C.

Fecha de Caducidad: Ver la fecha de caducidad en la caja de cada cartucho de reactivo cerrado. Los pocillos sellados o no hidratados de cartuchos en el instrumento, son estables 30 días. Los pocillos abiertos por el instrumento son estables 5 días.

Toma de Muestras: Para las muestras a ser analizadas por este método, deben emplearse los procedimientos habituales de recogida y conservación de suero y plasma.⁵

*Sustancias de Interferencia Conocida

- La bilirrubina (conjugada) de 8.1 mg/dL [139 mmol/L]⁶ y la bilirrubina (no conjugada) de 9.4 mg/dL [161 mmol/L] disminuyeron el resultado de colesterol en 15 mg/dL [0.4 mmol/L] a una concentración de colesterol de 150 mg/dL [3.9 mmol/L].
- La bilirrubina (conjugada) de 12.8 mg/dL [219 mmol/L] y la bilirrubina (no conjugada) de 14.7 mg/dL [251 mmol/L] disminuyeron el resultado de colesterol en 25 mg/dL [0.7 mmol/L] a una concentración de colesterol de 250 mg/dL [6.5 mmol/L].

- Las siguientes sustancias tienen efectos despreciables (<10 mg/dL [0.3 mmol/L]) en el método colesterol a las concentraciones indicadas:

Acetaminofén	200 µg/mL	[1.3 mmol/L]
Ampicilina	20 µg/mL	[57 µmol/L]
Diazepam	20 µg/mL	[70 µmol/L]
Digoxina	20 ng/mL	[25.6 nmol/L]
EDTA	200 mg/dL	[2 µL] ⁷
Etanol	800 mg/dL	[174 mmol/L]
Gentamicina	16 µg/mL	[29.4 µmol/L]
Hemoglobina	500 mg/dL	[0.31 mmol/L] monómero
Lipemia	600 mg/dL	[6.86 mmol/L] triglicéridos
Nortriptilina	1000 ng/mL	[3797 nmol/L]
Fenobarbital	80 µg/mL	[344 µmol/L]
Fenitoína	30 µg/mL	[119 µmol/L]
Ácido Salicílico	100 mg/dL	[7.24 mmol/L]
Teofilina	100 µg/mL	[555 µmol/L]

- La interferencia debida a las estatinas en las concentraciones indicadas fue inferior al 10% cuando se añaden a una mezcla de suero con 151 mg/dL [3.9 mmol/L] de colesterol.

Atorvastatina	3.6 mg/dL	[2.98 mmol/L]
Lovastatina	2.0 mg/dL	[4.94 mmol/L]
Pravastatina	10.3 mg/dL	[23.07 mmol/L]
Simvastatina	6.9 mg/dL	[16.48 mmol/L]

- Para verificar la linealidad, utilice mezclas altas y bajas de suero o productos de verificación de la linealidad disponibles en el mercado. Se recomienda que las muestras utilizadas para determinar la linealidad tengan menos de 600 mg/dL [6.78 mmol/L] de triglicéridos.

- Oxalato potásico/Fluoruro sódico pueden disminuir los resultados de colesterol un 12% aproximadamente.

- Heparina lítica puede reducir los resultados de colesterol 4 mg/dL [0.1 mmol/L] por término medio en niveles de 200 mg/dL [5.2 mmol/L].

- Los tubos de recogida de sangre Corvac® y SST® no afectan los resultados CHOL.

- Cada laboratorio debe determinar la aceptabilidad de sus propios tubos de recogida de sangre y productos de separación del suero. Pueden haber variaciones en estos productos de fabricante a fabricante e inclusive, algunas veces, de lote a lote.

Corvac® es una marca registrada de Monoject, Division of Sherwood Medical, St. Louis, MO.

SST® es una marca registrada de Becton-Dickinson, Rutherford, NJ.

- Las unidades del Système International d'Unités se indican entre paréntesis.

Procedimiento: Se necesita el cartucho de reactivos CHOL Flex®, Cat. No. DF27, para llevar a cabo el método CHOL. Esta prueba se efectúa en los sistemas de química clínica Dimension®, una vez que el método ha sido calibrado (ver la sección de Calibración).

Proceso de Análisis

El muestreo⁸, dispensación de reactivos, mezcla, procesado e impresión de resultados son efectuados automáticamente por el sistema Dimension®. Para más detalles sobre este proceso, referirse al manual de su sistema Dimension®.

- El contenedor de la muestra (si no es un tubo primario) debe tener la cantidad suficiente para contener el volumen de muestra necesario más el volumen muerto. No es necesario el llenado exacto de dicho contenedor.

Condiciones del Análisis

- Volumen de la muestra: 3 µL
- Volumen de reactivo 1: 88 µL
- Volumen de reactivo 2: 26 µL
- Volumen de diluyente: 241 µL
- Temperatura del ensayo: 37 °C
- Longitud de onda: 452, 540, 700 nm
- Tipo de medición: punto final policromático

ANEXO 12

Dimension® clinical chemistry system Flex® reagent cartridge

AHDL

Fecha de la edición 2009-07-22

Colesterol HDL automatizado

Uso previsto: El método AHDL es un análisis de diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) en suero y plasma humanos con el sistema de química clínica Dimension®. Las determinaciones del C-HDL se utilizan como ayuda en el diagnóstico de trastornos lipídicos (como la diabetes mellitus) y diversas enfermedades hepáticas y renales, así como en la evaluación del riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular.

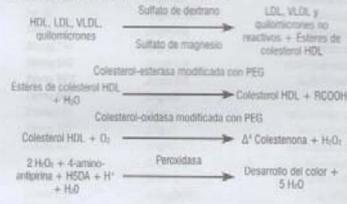
Resumen: Las lipoproteínas del plasma son partículas esféricas de diversas composiciones. La superficie externa de estas partículas está constituida por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas; el núcleo interno contiene fundamentalmente colesterol esterificado y triglicéridos. Las lipoproteínas solubiliza y transportan el colesterol y los triglicéridos en el torrente sanguíneo.

Desde el punto de vista clínico se distinguen cuatro tipos de lipoproteínas, en función de las proporciones relativas de su contenido lipídico y proteínico: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). La función principal de las HDL es transportar el colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, donde se metaboliza.¹ Se ha postulado que este proceso, conocido como transporte inverso de colesterol, es un mecanismo de protección cardiovascular. Se considera en líneas generales que los pacientes con concentraciones bajas de colesterol HDL tienen un mayor riesgo de enfermedad coronaria.²

La determinación de la concentración sérica de colesterol HDL es una herramienta útil para identificar a los pacientes de riesgo. El Panel de tratamiento de adultos del National Cholesterol Education Program (NCEP) de Estados Unidos recomienda que todos los adultos de 20 años o más se midan la concentración de colesterol total y HDL al menos una vez cada 5 años para evaluar su riesgo de enfermedad coronaria.³

El método de referencia para la determinación del colesterol HDL utiliza ultracentrifugación y precipitación química para separar las HDL de las otras lipoproteínas, seguido de la determinación del contenido de colesterol mediante el método de Abel-Kendall. Debido a que este procedimiento es tedioso y requiere disponer de una ultracentrífuga, la mayoría de los laboratorios utiliza hoy día métodos que miden selectivamente el C-HDL por medios químicos.

Principios del procedimiento: El análisis de AHDL determina la concentración sérica de colesterol asociado a las HDL de forma directa, sin necesidad de pretratamientos de la muestra ni de pasos de ultracentrifugación especializados, utilizando un formato de dos reactivos. En la primera reacción, los quilomicrones, las VLDL y las LDL forman complejos hidrosolubles con sulfato de dextrano en presencia de sulfato de magnesio. **Estos complejos son resistentes a la colesterol-esterasa y a la colesterol-oxidasa modificadas con polietilenglicol (PEG)**, que reaccionan con el colesterol asociado a las HDL. En presencia de oxígeno, el colesterol asociado a las HDL se oxida a 2,4-colestanona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno generado reacciona a continuación con 4-aminotripirina y N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetisilamina (HSDA) de sodio en presencia de peroxidasa para formar un colorante con color que se mide mediante una técnica de punto final bicromático (600/700 nm). La intensidad del color del colorante es directamente proporcional a la concentración sérica de C-HDL.



Reactivos	Pocillos ^a	Forma	Ingredientes	Concentración ^b	Origen
1, 2, 3	Líquido	Tampón HEPES		10,07 mmol/L, pH 7,4	
(Reactivo 1)		Acido 2-(N-ciclohexilamino)etansulfónico		96,95 mmol/L	
		Sulfato de dextrano		1,5 g/L	
		Nitrato de magnesio hexahidrato		≥ 11,7 mmol/L	
		N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetisilamina		0,96 mmol/L	
		Ascorbato-oxidasa		≥ 50 µkat/L	bacteriano
		Peroxidasa		≥ 16,7 µkat/L	ribano
		Conservante			
4	Líquido	Tampón de HEPES		10,07 mmol/L, pH 7,0	
(Reactivo 2)		Colesterol-esterasa modificada con PEG		≥ 3,33 µkat/L	bacteriano
		Colesterol-oxidasa modificada con PEG		≥ 127 µkat/L	bacteriano
		Peroxidasa		≥ 333 µkat/L	ribano
		4-Amino-tripirina		2,46 mmol/L	
		Conservante			
5, 6	Líquido	NaOH		1,00 M	

- Los pocillos aparecen numerados consecutivamente desde el extremo ancho del cartucho.
- Valor nominal por pocillo en un cartucho.
- El hidróxido de sodio se utiliza como una solución limpiadora de sondas y no se usa en la reacción.

Riesgos y seguridad



Corrosivo.
R34:
S26:
536/37/39:
S45:

Contiene hidróxido de sodio. Provoca quemaduras. En caso de contacto con los ojos, lávese inmediatamente y abundantemente con agua y acúdsese a un médico. Úsese indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. En caso de accidente o malestar, acúdsese inmediatamente al médico. (si es posible, muéstrele la etiqueta).

Las fichas de datos de seguridad (MSDS/SDS) están disponibles en www.siemens.com/diagnostics

Precauciones: Contiene azida de sodio (<0,1%) como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con tuberías de cobre o de plomo en los conductos de drenaje y formar compuestos explosivos. Elimine este producto de forma apropiada conforme a la normativa local. Las cubetas usadas contienen fluidos corporales humanos, por lo que deben manipularse con cuidado para evitar la ingestión y el contacto con la piel.

Para uso diagnóstico *in vitro*

Preparación del reactivo: Todos los reactivos son líquidos y están listos para su uso.

Conservar a: 2 - 8 °C

Caducidad: Consulte en el envase la fecha de caducidad de los cartuchos de reactivos individuales sin abrir. En el instrumento, los pocillos sellados son estables durante 30 días.

Estabilidad de los pocillos abiertos: 3 días para los pocillos 1 - 3
10 días para el pocillo 4
15 días para los pocillos 5 - 6

Recogida de muestras y manipulación

Tipos de muestras recomendados: suero y plasma (heparina de sodio o liso).

El suero y el plasma deben obtenerse después de un periodo de 12 horas de ayuno utilizando los procedimientos recomendados para la obtención de muestras de sangre para diagnóstico mediante venopunción.⁴ Antes de la centrifugación, debe producirse la formación completa del coágulo. El suero o el plasma deben separarse físicamente de las células lo antes posible, con un límite máximo de dos horas desde el momento de la obtención de la muestra.⁴ Las muestras deben estar libres de partículas.

Las muestras de suero o de plasma pueden refrigerarse a una temperatura de 2 - 8 °C durante un máximo de 7 días si no se analizan en un plazo de 8 horas. Para un almacenamiento más prolongado, las muestras pueden congelarse a -70 °C durante un máximo de tres meses. Las muestras pueden congelarse una vez. Cuando se utilizan muestras almacenadas a 2 - 8 °C o a -70 °C, pueden observarse incrementos o reducciones de hasta el 10% en las concentraciones de C-HDL.

Siga las instrucciones de uso y procesamiento suministradas con el dispositivo de recogida de muestras.⁴

Procedimiento

Materiales suministrados

Cartucho de reactivos Flex® de AHDL, ref. DF488

Materiales necesarios pero no suministrados

Calibrador AHDL, ref. DC488

Materiales de control de calidad

Proceso del análisis

El sistema de química clínica Dimension® realiza de manera automática el muestreo⁵, la dispensación de reactivos, la mezcla y el procesamiento. Para más detalles sobre este proceso, consulte el Manual del usuario del sistema Dimension®.

d. El recipiente de la muestra debe tener la cantidad suficiente para contener el volumen de muestra necesario más el volumen muerto. No se requiere el llenado exacto del recipiente.

Condiciones del análisis

Volumen de la muestra 3 µL
Volumen del reactivo 1 300 µL
Volumen del reactivo 2 100 µL
Temperatura 37,0 °C ± 0,1 °C
Tiempo de reacción 8,6 minutos
Longitud de onda 600 y 700 nm
Tipo de medición Punto final bicromático

ANEXO 13

REF DF69A

DADE BEHRING

Dimension® clinical chemistry system

Flex® reagent cartridge

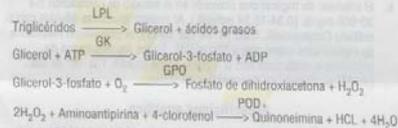
TGL

Cartucho de Reactivos Flex® de Triglicéridos

Uso: El método TGL empleado por el sistema de química clínica Dimension® es un análisis de diagnóstico in vitro que tiene por objeto la determinación cuantitativa de triglicéridos en suero y plasma. Los resultados obtenidos se utilizan para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con diabetes mellitus, nefrosis, obstrucción hepática, otras enfermedades relacionadas con el metabolismo de lípidos, y diversos trastornos endocrinos.

Resumen: Los triglicéridos son lípidos insolubles en agua compuestos por tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol. Los triglicéridos son transportados por la sangre en forma de constituyentes básicos de todas las lipoproteínas, pero la mayor concentración de este tipo de moléculas se transporta en los quilomicrones ricos en triglicéridos y en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).¹ Las lipasas y los ácidos biliares hidrolizan los triglicéridos, dando como resultado glicerol y ácidos grasos, que son absorbidos por tejido adiposo para su almacenamiento o por otros tejidos que requieran una fuente de energía. Las concentraciones máximas de triglicéridos asociados a quilomicrones se observan entre las 3 y las 6 horas posteriores a la ingestión de una comida rica en grasas; no obstante, la velocidad de absorción de las grasas varía significativamente en función de la persona y de la composición dietaria de las grasas. Una vez absorbidos, los triglicéridos vuelven a sintetizarse en las células epiteliales y se combinan con colesterol y diversas apolipoproteínas para formar quilomicrones.²

Principios del procedimiento: El método de Triglicéridos se basa en un procedimiento enzimático en el que se emplea una combinación de enzimas para determinar la concentración de triglicéridos en suero o plasma. La muestra se incuba con un reactivo enzimático, la lipoproteína lipasa (LPL), que transforma los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres. La glicerol quinasa (GK) cataliza la fosforilación del glicerol por adenosina-5-trifosfato (ATP) para formar glicerol-3-fosfato. La glicerol-3-fosfato oxidasa cataliza la oxidación del glicerol-3-fosfato para producir fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La acción catalítica de la peroxidasa (POD) sobre el H₂O₂, aminoantipirina y 4-clorofenol produce quinoneimina. El cambio en la absorbancia provocado por la formación de quinoneimina es directamente proporcional a la cantidad total de glicerol (y sus precursores) en la muestra, y se mide utilizando una técnica de punto final bicromática (510, 700 nm).



Reactivos

Pocillos*	Forma	Ingredientes	Concentración ^{b,c}
1-6	Líquido	Lipoproteína lipasa	7.5 KU/L
		ATP	3 mmol/L
		Glicerol quinasa	0.5 KU/L
		Glicerol-3-fosfato oxidasa	2.2 KU/L
		4-aminoantipirina	0.75 mmol/L
		4-clorofenol	8 mmol/L
		Peroxidasa	5 KU/L
		Mg ²⁺	22.5 mmol/L
		Tampón pH 7.2	50 mmol/L

a. Los pocillos están numerados consecutivamente a partir del extremo ancho del cartucho.

b. Representa el valor nominal en la mezcla de reacción final.

c. Contiene albúmina de suero bovino.

Precauciones: Contiene azida sódica como inhibidor microbiano (< 0.1%). La azida sódica puede reaccionar con el cobre o el plomo de las tuberías formando compuestos explosivos. Desechar de forma adecuada este producto como material biopeligroso minimizando esta posibilidad. Las cubetas usadas contienen fluidos orgánicos humanos. Manipular con el cuidado necesario para evitar la ingestión o el contacto con la piel.

Para uso diagnóstico in vitro

Instrucciones de almacenamiento: Guardar a 2 - 8° C.

Fecha de caducidad: Consulte en la caja la fecha de caducidad de los cartuchos de reactivos individuales cerrados. Los pocillos del cartucho cerrados en el instrumento son estables durante 30 días. Una vez que el instrumento ha abierto los pocillos 1 a 6, son estables durante 10 días.

Recogida de muestras: Los procedimientos normales de extracción y conservación de suero y plasma pueden utilizarse para las muestras que vayan a analizarse mediante este método.³ Los tubos de recogida de sangre que tengan tapones lubricados con glicerol deben evitarse, ya que causarían resultados falsamente elevados. Las muestras de suero y plasma que no vayan a analizarse en un plazo de 24 horas pueden refrigerarse hasta 7 días. Para una conservación más prolongada, las muestras pueden congelarse a -20° C hasta tres meses o muchos años a -70° C.⁴

Sustancias de interferencia conocidas

- Pueden encontrarse pequeñas cantidades de glicerol libre en muestras de sangre de individuos sanos producidas por lipólisis natural. La concentración de glicerol libre puede aumentar en presencia de factores como estrés, enfermedad o administración de infusiones intravenosas.⁵ Es posible que el glicerol libre y otros políoles causen una interferencia positiva.
- No deben utilizarse productos de control de calidad a base de glicerol con este método.
- La prueba de interferencia se realizó de acuerdo con el Protocolo EP7-P del NCCLS.
- Las siguientes sustancias no interfieren con el método TGL si existen en suero en las concentraciones indicadas. Las imprecisiones (derivas) provocadas por estas sustancias son inferiores al 10% a una concentración de triglicéridos de 200 mg/dL [2.26 mmol/L].

Acetaminofeno	20 mg/dL	[1323 µmol/L] ^d
Albúmina	6.8 g/dL	[68 g/L]
Amicacina	15 mg/dL	[256 µmol/L]
Ampicilina	5 mg/dL	[143 µmol/L]
Ácido ascórbico	3 mg/dL	[170.3 µmol/L]
Bilirrubina	60 mg/dL	[1026 µmol/L]
Cafelina	10 mg/dL	[515 µmol/L]
Carbamacepina	12 mg/dL	[508 µmol/L]
Cloramfenicol	25 mg/dL	[774 µmol/L]
Clordiacepóxido	2 mg/dL	[67 µmol/L]
Clorpromacina	5 mg/dL	[157 µmol/L]
Colesterol	500 mg/dL	[13.0 mmol/L]
Cimetidina	10 mg/dL	[396 µmol/L]
Creatinina	30 mg/dL	[2652 µmol/L]
Dextrano 75	2500 mg/dL	[333 µmol/L]
Diazepam	2 mg/dL	[70 µmol/L]
Digoxina	5 mg/mL	[6.4 nmol/L]
Eritromicina	20 mg/dL	[273 µmol/L]
Etanol	350 mg/dL	[76 mmol/L]
Etosuximida	30 mg/dL	[2125 µmol/L]
Furosemida	2 mg/dL	[61 µmol/L]
Gentamicina	12 mg/dL	[251 µmol/L]
Heparina sódica	8000 U/L	[8000 U/L]
Hemoglobina (monómero)	500 mg/dL	[0.31 mmol/L]
Ibuprofeno	40 mg/dL	[1939 µmol/L]
Lidocaína	6 mg/dL	[256 µmol/L]
Litio (cloruro de litio)	3.5 mg/dL	[5.07 mmol/L]
Nicotina	2 mg/dL	[123 µmol/L]
Penicilina G	25 U/mL	[25,000 U/L]
Pentobarbital	10 mg/dL	[442 µmol/L]
Fenobarbital	15 mg/dL	[648 µmol/L]
Fenitoína	10 mg/dL	[396 µmol/L]
Primidona	10 mg/dL	[458 µmol/L]
Propoxifeno	0.4 mg/dL	[12 µmol/L]
Proteínas: Total	3.6 g/dL	[36 g/L]
Proteínas: Total	11.8 g/dL	[118 g/L]
Factores reumatoideos	500 IU/mL	[500 IU/mL]
Ácido salicílico	50 mg/dL	[3.62 mmol/L]
Toclilina	25 mg/dL	[1388 µmol/L]
Urea	500 mg/dL	[88.3 mmol/L]
Ácido úrico	20 mg/dL	[1.2 mmol/L]
Ácido valproico	50 mg/dL	[3467 µmol/L]

- Los tubos de recogida de sangre Corvac, y SST, no afectan a los resultados TGL.

• Cada laboratorio debe establecer las normas de aceptabilidad para sus propios tubos de recogida de sangre y productos de separación del suero. Puede haber variaciones entre productos de diferentes fabricantes y, en ocasiones, entre distintos lotes.

Corvac® es una marca registrada de Monoject, Division of Sherwood Medical, St. Louis, MO.

SST® es una marca registrada de Becton-Dickinson, Rutherford, NJ.

d. Las unidades del Système International d'Unités se indican entre corchetes.

Procedimiento: Se necesita el cartucho de reactivos Flex® TGL, N° de Cat. DF69A, para llevar a cabo el método TGL. Esta prueba se efectúa en el sistema de química clínica Dimension® una vez que el método ha sido calibrado (ver la sección de Calibración del manual del sistema Dimension®).

Materiales necesarios

Cartucho de reactivos Flex® de Triglicéridos, N° de Cat. DF69A
Calibrador Química II, N° de Cat. DC20

Proceso de análisis

El muestreo, dispensación de reactivos, mezclado, procesado e impresión de resultados son efectuados automáticamente por el sistema Dimension®. Para obtener más detalles sobre este proceso, consulte el manual del sistema Dimension®.

e. La copa de la muestra (si no es un tubo primario) debe tener la capacidad suficiente para contener el volumen de muestra necesario más el volumen muerto.

Condiciones del análisis

- Volumen de la muestra 4 µL
- Volumen de Reactivo 1 133 µL
- Temperatura del ensayo 37 °C ± 0.1°C
- Longitudes de onda 510 y 700 nm
- Tipo de medición punto final bicromático
- Unidades mg/dL (mmol/L)
- Volumen de muestra sujeto a autodilución 2µL

Calibración

El procedimiento general para la calibración se describe en el manual del sistema Dimension®.

Para la calibración del método de triglicéridos deben considerarse los siguientes datos:

- Intervalo de ensayo: 15 – 1000 mg/dL [0.17 – 11.3 mmol/L]
- Materiales de referencia: Estándares primarios como el Calibrador Química II de Dimension®, (N° de Cat. DC20) o calibradores secundarios.
120, 240, 485 mg/dL
[1.37, 2.74 5.54 mmol/L]
- Niveles de calibración: Tres niveles por triplicado
- Esquema de calibración: Cada lote nuevo de cartuchos de reactivos o cada 90 días para el mismo lote
- Frecuencia de calibración: Coeficientes asignados: C₀ -2.6
C₁ 1.5
- f. Para verificar el intervalo del ensayo deben emplearse muestras basadas en triglicéridos (y no muestras de glicerol).

Control de calidad

Al menos una vez cada día que se utilice, analice dos niveles de un material de control de calidad con concentraciones conocidas de triglicéridos. Si los resultados están fuera de los límites aceptables para el laboratorio, siga el procedimiento especificado en el manual del sistema Dimension®.

Existe la posibilidad de un funcionamiento incorrecto del sistema si se obtiene la siguiente precisión en 5 pruebas consecutivas:

Concentración	D.E. (Desviación Estándar)
100 mg/dL [1.13 mmol/L]	>5 mg/dL [0.06 mmol/L]
400 mg/dL [4.53 mmol/L]	>16 mg/dL [0.18 mmol/L]

Resultados: El instrumento calcula e imprime automáticamente la concentración de triglicéridos en mmol/L empleando el esquema de cálculo incluido en el manual del sistema Dimension®.

Limitaciones del procedimiento:

- Resultados:** > 1000 mg/dL [11.3 mmol/L]
- Dilución manual:** Hacer la dilución apropiada con agua purificada para obtener un resultado dentro del intervalo del ensayo. Introduzca el factor de dilución.
Reanalice. La lectura de resultados se corrige según la dilución.
- Autodilución (AD):** Cuando se emplea la función de autodilución, los resultados por encima de 1000mg/dL [11.3 mmol/L] se repetirán automáticamente.
- Resultados:** < 15 mg/dL [0.17 mmol/L] deberán informarse como inferiores a 15 mg/dL [0.17 mmol/L].

El sistema de generación de informes del instrumento incluye mensajes de error que alertan al operador de fallos específicos de funcionamiento. Cualquier informe que contenga este tipo de mensajes de error deberá retenerse para su seguimiento.

Consulte el manual del sistema Dimension®.

Intervalo de referencia:

El National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP- ATP III)⁶ clasifica las concentraciones de triglicéridos en las siguientes categorías:

Categoría	Triglicéridos en suero	
	mg/dL	[mmol/L]
Normal	< 150	< 1.70
En el límite alto	150 – 199	1.70 – 2.25
Alta	200 – 499	2.26 – 5.64
Muy alta	≥ 500	≥ 5.65

Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia para los análisis de triglicéridos procesados en el sistema Dimension®.

Características específicas de funcionamiento^g

Material	Reproducibilidad ^{h,i}		
	Media mg/dL (mmol/L)	Desviación estándar Intra serie	Desviación estándar (% CV) Total
Multiqua®			
Nivel 2	132 [1.49]	0.7 [0.01] (0.5)	1.1 [0.01] (0.8)
Nivel 3	216 [2.44]	0.9 [0.01] (0.4)	1.5 [0.02] (0.7)
Pool de plasma	364 [4.11]	1.4 [0.02] (0.4)	3.6 [0.04] (1.0)
Pool de suero	425 [4.80]	1.5 [0.02] (0.4)	5.5 [0.06] (1.3)

Multiqua, es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA, 92618-2017.

- g. Todas las pruebas de características específicas de funcionamiento se procesaron tras haber realizado las comprobaciones normales recomendadas de control de calidad del sistema Dimension® RxL. (Consulte el manual del sistema Dimension®).
- h. Las pruebas de reproducibilidad se realizaron de acuerdo con la Directriz aprobada por el NCCLS para la evaluación de la precisión en dispositivos de química clínica (NCCLS Approved Guideline for Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices - EPS-A, Feb. 1990).
- i. Las muestras de cada nivel se analizaron por duplicado, una vez al día, durante 20 días. Las desviaciones estándar intra serie y total se calcularon mediante el método de análisis de varianza.

Estadísticas de regresión de correlación^j

Método Comparativo	Pendiente	Intersección	Coefficiente de Correlación	n ^k
Dimension® TRIG	1.01	-4.2 [-0.5]	0.999	230

- j. El modelo de la ecuación para la estadística de regresión es: Resultados del analizador Dimension® = [pendiente x resultados del método comparativo] + intersección.
- k. El intervalo de triglicéridos obtenido en el estudio de correlación fue 30-906 mg/dL [0.34-10.24 mmol/L]. Al analizar muestras diluidas con el método Dimension®, TRIG (N° de Cat. DF69), se obtuvieron resultados de triglicéridos superiores a 500 mg/dL. Todos los resultados de triglicéridos analizados con el método Dimension®, TGL (N° de Cat. DF69A) se obtuvieron de muestras sin diluir.

Especificidad analítica

Consulte la sección Sustancias de interferencia conocidas.

Clave de los Símbolos: Ver hoja adjunta.

Bibliografía: Ver hoja adjunta.

Dimension® y Flex® son marcas registradas de Dade Behring Inc., en la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los EEUU, en Alemania y muchos otros países.

Un asterisco (*) indica una sección revisada.

Dade Behring Inc.
Newark, DE 19714, U.S.A.



Dade Behring Limited
Walton Manor, Walton
Milton Keynes MK7 7AJ
United Kingdom



2001-08 B PW 717065 101-ES

ANEXO 14

OXIDISED LDL

ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF OXIDISED LDL
IN HUMAN EDTA PLASMA AND SERUM
CAT. NO. BI-20042. 12 X 8 TESTS

ENZYMIMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON OXIDIERTEM LDL
IN HUMANEM EDTA PLASMA ODER SERUM
KAT. NR. BI-20042. 12 X 8 TESTE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES

rev.no. 080401 (replacing 080205)

Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.at

BIOMEDICA
BIOMEDICA
GRUPPE 
www.bmgrp.com

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml reaction vials
- Precision pipettes calibrated to deliver 10-1000 μ l and disposable tips
- ELISA reader for absorbance at 450 nm (or from 450 nm to 620 nm)
- Graph paper or software for calculation of results
- Incubator
- Distilled or deionised water

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

Samples should be stored at -20°C , for long term storage store at -70°C . Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values.

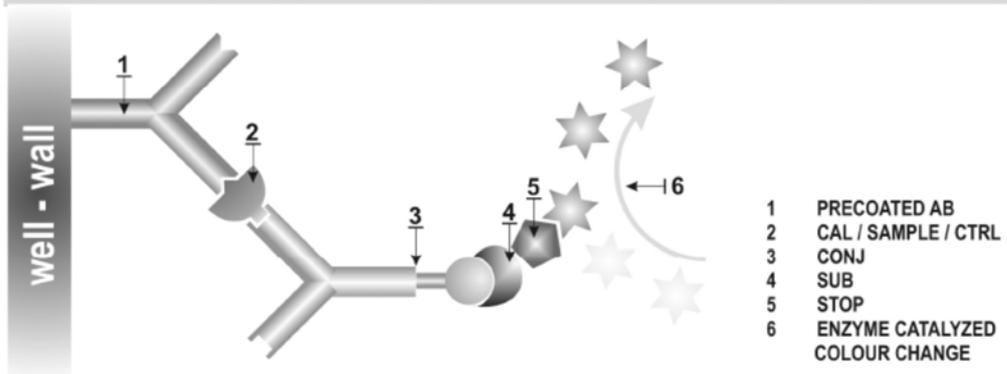
Handling / Reconstitution:

- STD (standards) and CTRL (control) are supplied frozen. Immediately put them at or below -20°C after receipt. 5 freeze-thaw cycles can be performed without loss of activity. They are stable until expiry date stated on the label when stored at or below -20°C
- WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water). Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. Diluted buffer is stable at $2-8^{\circ}\text{C}$ until expiry date stated on label. Use only diluted WASHBUF (Wash buffer) for the assay performance.

The EDTA-plasma and serum samples should be diluted 1+9 (e.g. 50 μ l + 450 μ l) with ASYBUF (assay buffer) prior to analyses.

Standards and control are after thawing ready to use and **MUST NOT** be diluted.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.
Mark position for BLANK/STD (Standards)/SAMPLE/CTRL (Control) on the supplied protocol sheet.
Take microtiter strips out of the alubag, take a minimum of one well as Blank. Store unused strips with desiccant at 2-8°C in the alubag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

Add 100 µl STD/CTRL/diluted SAMPLE (Standard./Control, /diluted Sample) in duplicate into respective wells.
Cover the strips tightly and incubate at 37°C for 2 hours.
Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). Remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the latest wash.
Add 100 µl CONJ (Conjugate, anti oxLDL antibody - HRPO) into each well, except blank.
Cover the strips tightly and incubate at 37°C for 1 hour.
Aspirate and wash wells 5x with 300 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). Remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the last wash.
Add 100 µl SUB (Substrate) into each well.
Incubate at room temperature (18-26°C) for 30 minutes in the dark.
Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well, shake well.
Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 620 nm, if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Subtract the blank extinction from all other values. Construct standard curve from standard values. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this calibration curve.

The results of the diluted samples (ng/ml) must be multiplied by 10.

The assay has been evaluated using a 4PL algorithm. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user. Respective dilution factors have to be considered.

The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit. Data for optical density obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an optical density of 1.00 is obtained for the standard with the highest concentration.

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Reference data :	Each laboratory should establish its own reference data.
Standard range:	0 to 750 ng/ml
Sample volume:	50 µl human serum or EDTA plasma
Detection Limit:	(0 ng/ml + 3 SD): 0.8 ng/ml
Incubation time:	2 h / 1 h / 30 min

10) PRECISION

Intra-Assay (n=16)			Inter-Assay (n=10)		
Mean (ng/ml)	490.3	360.9	Mean (ng/ml)	556.9	393.5
SD	17.4	27.6	SD	59.3	24.3
CV%	4.0	7.6	CV%	10.7	6.2

Data are corrected for dilution 1:10 (1+9)

ANEXO 15



Anti-Human Hsp60 (total) ELISA Kit

**For the detection and quantitation
of antibodies to Hsp60 in serum.**

Catalog Number: EKS-650

TOLL FREE 1-800-833-8651 FAX 734-668-2793
INFO <http://www.assaydesigns.com>

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC OR
THERAPEUTIC PROCEDURES.

A. INTRODUCTION

ASSAY DESIGN

The Assay Designs™ Anti-Human Hsp60 (total) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Kit provides a method to detect and quantitate antibodies to human Hsp60 in serum samples from human origin. This assay allows for reproducible, accurate and precise determination of IgG, IgA and IgM antibodies (total) to human Hsp60 in serum.

Assay Designs Anti-Human Hsp60 (total) ELISA Kit uses recombinant human Hsp60 bound to the wells of the Rec. Human Hsp60 Immunoassay Plate to bind anti-human Hsp60 antibodies present in human serum. The captured anti-human Hsp60 antibodies are detected with a hydrogen peroxidase conjugated goat polyclonal antibody specific for human IgG, IgA and IgM molecules. The assay is developed with tetramethylbenzidine substrate producing a blue color in proportion to the amount of captured anti-human Hsp60 antibodies. The color development is stopped with acid stop solution which converts the endpoint color to yellow. The intensity of the color is measured in a microplate reader at 450nm.

Traditional methods for detection and quantitation of antihuman Hsp60 antibodies were accomplished by using prescreened serum samples with a high level of anti-human Hsp60. These samples were assigned a concentration of 1000 arbitrary units/mL (Aunits/mL) and were used to generate standard dose-response curves from which antibody levels in test samples were determined.

Assay Designs Anti-Human Hsp60 (total) ELISA kit uses a calibrated standard of anti-human Hsp60 (IgG/A/M) isolated from pooled human sera to generate a standard curve. The kit provides researchers with a rapid, reliable and standardized method to measure the levels of anti-human Hsp60 in human serum samples by interpolating absorbance readings from the standard curve.

INTRODUCTION

ASSAY PROCEDURE SUMMARY

1. Bring to room temperature: **Rec. Human Hsp60 Immunoassay Plate**, **20X Wash Buffer**, **Sample Diluent 1**, **TMB Substrate** and **Stop Solution 2**.
2. Centrifuge **Anti-Human Hsp60 Standard** before removing cap. **Caution!** This component is derived from human serum. **Treat as biohazard.**
3. Dilute **Anti-Human Hsp60 Standard** and samples in **Sample Diluent 1**.
4. Add 100µL prepared standards and samples in duplicate to wells of **Rec. Human Hsp60 Immunoassay Plate**. Cover immunoassay plate.
5. Incubate plate at room temperature for 2 hours.
6. Wash wells 4X with 1X Wash Buffer.
7. Add 100µL **Anti-Human GAM:HRP Conjugate** to each well. Cover immunoassay plate.
8. Incubate plate at room temperature for 1 hour.
9. Wash wells 4X with 1X Wash Buffer.
10. Add 100µL **TMB Substrate** to each well.
11. Incubate at room temperature for 15 minutes.
12. Add 100µL **Stop Solution 2** to each well.
13. Measure absorbance at 450nm.
14. Plot the anti-human Hsp60 (IgG/A/M) standard curve and calculate the anti-human Hsp60 sample concentrations.