

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**LABORATORIO DE HEMOSTASIA Y BIOLOGÍA VASCULAR DE
LA DIVISIÓN DE POSGRADO**



**ESTUDIO DEL FACTOR VON WILLEBRAND EN PACIENTES
CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

**SANDRA EDITH LÓPEZ CASTAÑEDA
MÉDICO GENERAL**

TUTOR RESPONSABLE:

D.C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL
DEPARTAMENTO DE HEMOSTASIA Y BIOLOGÍA VASCULAR

CO-TUTOR:

DR. CARLOS ARTURO AREAN MARTÍNEZ
MÉDICO CARDIÓLOGO INTERVENCIONISTA

2011

I. DEDICATORIAS

A mis padres porque les debo todo lo que soy.

A mis hermanos por su apoyo y por creer en mí.

A mi Pepe y a mi hijo por su comprensión, su paciencia y apoyo.

A mi familia política por ser una verdadera familia que me ayuda y me apoya siempre que lo necesito.

II. AGRADECIMIENTOS

A Dios por la Vida, por la oportunidad de concluir esta etapa

A mis Directores de Tesis por creer en mí, una vez más.

A mis Asesores por su compromiso entero con este proyecto.

A mis profesores por todas sus enseñanzas y porque muchos de ustedes a pesar de no ser parte del proyecto se comprometieron con el desarrollo del mismo.

A mis amigos y compañeros del IIQB por su apoyo, sus aportaciones, por sus sonrisas y por todas sus enseñanzas, pero sobre todo por su amistad.

A mis compañeras del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vasculare por su amistad y sus sonrisas.

A mi Facultad porque una vez más fue mi segunda casa, porque me ha brindado los medios para llegar hasta aquí.

A la Dra Elba Reyes por su apoyo e importantes aportaciones al desarrollo de la técnica.

III. INDICE

I.	Dedicatorias.....	II
II.	Agradecimientos	III
III.	Índice	IV
IV.	Abreviaturas	VI
1.	Resumen	1
2.	Marco Teórico.....	2
2.1.	Síntesis del Factor von Willebrand	3
2.2.	Almacenamiento y liberación	4
2.3.	El FvW en la Hemostasia	5
2.4.	El FvW y el Síndrome Coronario Agudo	7
2.5.	Angina Estable.....	8
2.6.	SICA I: Infarto Agudo Miocárdico con elevación del segmento ST (IAMCESST)	9
2.7.	SICA II: Infarto Agudo Miocárdico sin elevación del segmento ST (IAMSESST) y angina inestable.....	10
3.	Justificación	15
4.	Hipótesis.....	15
5.	Objetivos	16
5.1.	Objetivo General	16
5.2.	Objetivos Específicos	16
6.	Diseño Metodológico	16
6.1.	Material	16
6.1.1.	Tipo de estudio	16
6.1.2.	Sitio del estudio	16
6.1.3.	Material Biológico	17

6.1.4.	Equipo	17
6.2.	Métodos	18
6.2.1.	Obtención de la muestra	18
6.2.2.	Métodos Inmunológicos	18
6.2.2.1.	Determinación del FvW mediante ELISA	18
6.2.3.	Estudio de los Multímeros del FvW	19
6.2.3.1.	Electroforesis del FvW en geles de poliacrilamida 3%/agarosa 0.8% con docecil sulfato de sodio (SDS- PAGE)	19
6.2.3.2.	Electroforesis en geles de agarosa con SDS ...	20
7.	Resultados	25
8.	Discusión	34
9.	Conclusiones	37
10.	Bibliografía	38
11.	Anexos	42

IV.ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADAMTS 13	a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1
Da	Daltones
EIA	Electroinmunoanálisis
ELISA	Análisis inmunoabsorbente ligado a enzima
EvW	Enfermedad de von Willebrand
FvW	Factor von Willebrand
FvW:Ag	Porción antigénica del factor von Willebrand. Estudio de laboratorio que cuantifica la actividad del factor
FVIII	Factor VII coagulante
FVIII:Ag	Factor VIII antigénico; antigua denominación del Factor von Willebrand
GPIb	Glicoproteína plaquetaria Ib
GP α IIb β 3	Glicoproteína plaquetaria α IIb β 3
IET	Inmunolectrotransferencia
Kd	Kilodaltones
MAPM	Multímeros de alto peso molecular
Pre-pro-FvW	Polipéptido precursor del pro-factor de von Willebrand
Pro-FvW	Polipéptico precursor del FvW
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensajero
SDS	Dodecil sulfato de Sodio

1. RESUMEN

El Factor von Willebrand (FvW) es una molécula proteínica, sintetizada por las células del endotelio vascular y por las plaquetas, desempeña un papel fundamental en los procesos de adhesión y agregación plaquetaria, esencial en sitios de daño endotelial para formar trombos plaquetarios. La estructura multimérica es clave para el desempeño hemostático de la proteína. Los pacientes con niveles elevados de FvW tienen una mayor incidencia de eventos cardiacos adversos incluyendo la muerte. Todo lo anterior ha generado que el FvW se convierta en un punto clave de investigación para el desarrollo de nuevas terapias antiplaquetarias que inhiban específicamente a los receptores del FvW. Con la finalidad de estudiar el patrón electroforético de los multímeros del FvW en pacientes con Síndrome Coronario Agudo (SCA) nuestro estudio pretende estudiar si existen diferencias en la estructura multimérica del FvW que predispongan un estado de sangre vulnerable condicionado por concentraciones elevadas del FvW y la presencia de multímeros de elevado peso molecular del mismo.

De cada paciente se obtuvieron 10 ml de sangre por punción arterial en tubos vacutainer con citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante, se les realizó estudio de la concentración del FvW mediante ELISA. Además se estandarizó la metodología de laboratorio para el análisis de los multímeros del FvW por inmunoelectrotransferencia en geles de agarosa con SDS y geles de poliacrilamida agarosa.

Se incluyeron 30 pacientes, 26 hombres (86.6%) y 4 mujeres (13.33%), con un promedio de edad de 61 ± 10.3 años. Dentro de los antecedentes destaca que 14 (40%) tuvieron antecedente heredofamiliar de ECV, 20 (66.6%) antecedente personal de tabaquismo, 11 (36.6%) de DM, 119 (63.3%) de HTA y 22 (63.3%) de dislipidemia aterogénica. Los diagnósticos establecidos después de la Intervención Coronaria Percutánea (ICP) fueron: 19 (63.3%) con diagnóstico de Infarto Agudo del Miocardio (IAM) y 11 (36.6%) con diagnóstico de Angor Inestable (AI).

Se estandarizó la metodología para el análisis de los multímeros del FvW mediante electroforesis de geles de Agarosa con SDS y su posterior detección mediante Western Blot con anti-FvW y la reproducción una metodología en geles mixtos de poliacrilamida/agarosa (SDS-PAGE) así como un análisis comparativo de ambas metodologías para el estudio de los multímeros del FvW. Se realizaron varios corrimientos con muestras de pacientes isquémicos en los cuales se aprecia una diferencia en las características de los MAPM entre pacientes sanos y pacientes con Cardiopatía isquémica.

2. MARCO TEÓRICO

El Factor von Willebrand (FvW) es una glicoproteína multimérica plasmática que se sintetiza en las células endoteliales y los megacariocitos, Aproximadamente 75-85% del FvW circulante en plasma proviene del endotelio, mientras que el 15 al 25% deriva de las plaquetas. El FvW en su estadio maduro es la proteína sanguínea de mayor tamaño conocida hasta ahora.

El FvW es una molécula con numerosas interacciones funcionales, por lo que tiene una importante relación con la trombosis, desempeña un papel importante en la hemostasia primaria participando en la adhesión y agregación plaquetarias, así como en la hemostasia secundaria al actuar como una proteína acarreadora y estabilizadora del factor VIII protegiendo a este de la degradación proteolítica en circulación (Ruggeri y cols. 1993)

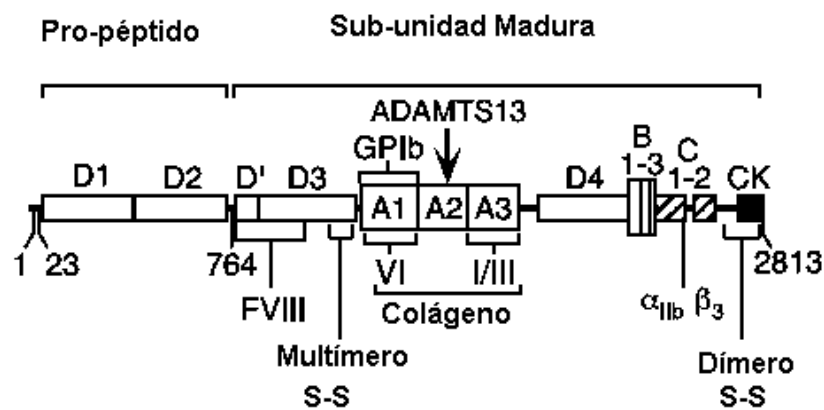


Figura 1. Estructura del FvW. El pre-proVWF consiste de un péptido señal (residuos 1--22), pro-péptido (23--763) y subunidad madura (764--2813). Los sitios de localización están indicados por dominios estructurales (A, B, C, D, CK), intersubunidades, puentes disulfuro (S--S), sitios de unión al ADAMST-13, sitios de unión para el factor VIII, GPIb, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, y colágeno tipo I, III y VI.

Journal of Thrombosis and Haemostasis, 7 (Suppl. 1): 24-27

El factor von Willebrand circula en el plasma en concentraciones de 8 a 25 $\mu\text{g/mL}$ (Kao y cols, 1981). El producto inicial del gen del FvW localizado en el cromosoma 12p13.2 es una proteína de 2,813 aminoácidos (aa) constituida por un péptido señal de 22 aa y un propéptido de 741 aa; una molécula de FvW contiene 2,050 aa (Rodeghiero y cols. 2002). Se forma mediante la unión de subunidades idénticas, el pre-pro FvW contiene cinco tipos de dominios estructurales en el orden D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK (Sadler 2005) (Fig 1)

2.1. Síntesis del Factor von Willebrand

Durante su síntesis el FvW experimenta una serie de cambios conformacionales en su estructura que son desencadenados por diferencias en el pH existente entre el retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi y el medio extracelular.

La formación de los multímeros del FvW depende de la capacidad del pro-péptido para promover la formación de enlaces disulfuro en el aparato de Golgi.

El producto inicial de la traducción es un gran polipéptido de 300 000 a 350 000 Daltones (300-350 kD), el cual pierde la fracción llamada péptido señal de 22 aminoácidos, que inicia el proceso de formación de multímeros.

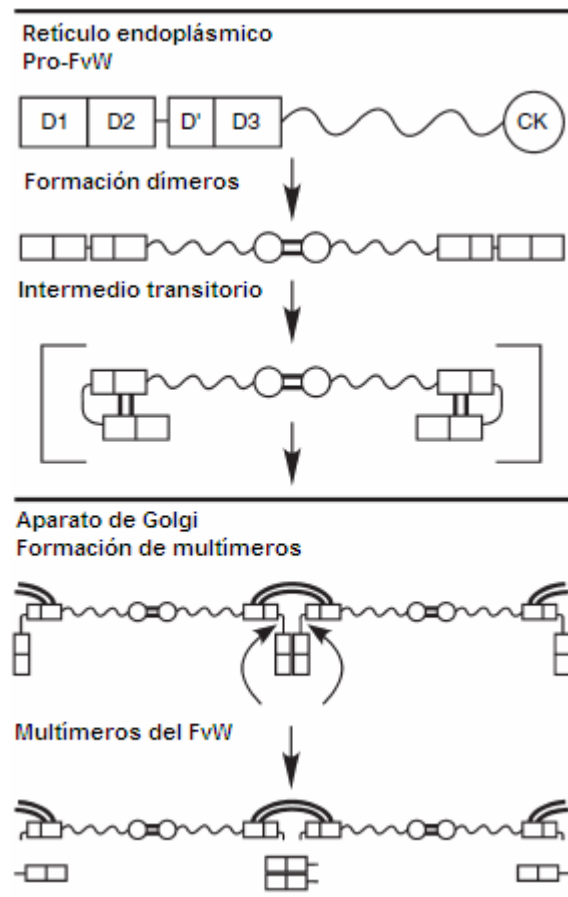


Figura 2. Formación de los multímeros del FvW. En el RE el proVWF forma dímeros entre las porciones carboxilo terminales. Los enlaces disulfuro están representados por una doble línea. Posteriormente un reacomodo transitorio en el RE que contiene puentes disulfuro en la porción (D1-D2) y en la región D3. En el aparato Golgi este reacomodo transitorio permite la formación de multímeros mediante puentes disulfuro en las porciones amino terminales entre los dominios D3.
Journal of Thrombosis and Haemostasis, 3: 1703

Las subunidades del FvW en el retículo endoplásmico forman dímeros mediante enlaces disulfuro en las porciones carboxilo terminales; posteriormente los dímeros del pro-FvW en el Aparato de Golgi son procesados por una proteasa procesa (probablemente Furina), genera un hendimiento en el pro-péptido (D1-D2) y la formación enlaces disulfuro adicionales en las porciones amino terminales entre los dominios D3, se forman así series de multímeros de diferente tamaño que van desde una sola unidad fundamental de 225 kD (2051 aminoácidos) hasta estructuras de más de 10 000 kD. (Wagner, 1990)

2.2. Almacenamiento y liberación

Los multímeros del FvW son condensados y empacados mediante arreglos tubulares para ser almacenados o liberados a la circulación, todos estos cambios permiten la síntesis de moléculas del FvW gigantes. (Sadler 2005) (Fig. 2)

El FvW se sintetiza principalmente por la célula endotelial se almacena cuerpos de Weibel-Palade, pero además puede encontrarse en los gránulos α de los megacariocitos precursores de plaquetas.

En la célula endotelial, el FvW se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de donde se libera al plasma o al subendotelio. El mecanismo mediante el cual el FvW es liberado aun no se conoce, aunque por estudios realizados *in vitro* utilizando como modelo células endoteliales de cordón umbilical humano, se ha determinado que la alfa-trombina humana interviene en su liberación. También el activador tisular del plasminógeno (t-PA), el ionóforo de calcio, la fibrina, plasmina, adrenalina, bradicinina y la interleucina-1 incrementan su liberación, en la forma de multímeros de alto peso molecular. Se sabe que la desamino-D-arginin-vasopresina (DDAVP), un análogo sintético de la vasopresina, incrementa el nivel del FvW en el plasma *in vivo*, al unirse al receptor V2 sobre la célula endotelial y posteriormente liberar la molécula del FvW; en la actualidad se sabe que la

morfología de los cuerpos de Weibel Palade es esencial para el despliegue adecuado del FvW. (Minchaux 2006)

2.3. El FvW en la hemostasia

La hemostasia en condiciones normales requiere del FvW debido a que esta proteína es necesaria para la adhesión plaquetaria normal a superficies trombogénicas y para la agregación plaquetaria y también debido a que funciona como portador de la molécula del FVIII procoagulante, que lleva a cabo una función esencial en el sistema de la coagulación como cofactor en la generación del factor Xa. Las alteraciones hipofuncionales del FvW conducen a una tendencia al sangrado, mientras que las hiperfuncionales pueden generar complicaciones trombóticas. (Sadler 2005)

Las plaquetas cuentan con dos receptores distintos para el FvW, la glicoproteína Ib en el complejo GP Ib-V-IV y en el complejo GP α Ib β 3, la primera está involucrada en la adhesión plaquetaria, donde el FvW actúa como puente entre los componentes de la pared vascular y los receptores específicos de la superficie plaquetaria. El complejo GP α Ib β 3 se une al FvW en la activación plaquetaria mediando la liberación de las proteínas plaquetarias en la superficie y por consiguiente la agregación plaquetaria. (Spiel y cols 2008)

El FvW circula en el plasma en series de multímeros que van de 500,000 a 20 millones Da, siendo los más grandes mucho más efectivos hemostáticamente (Budde y cols, 2006). Es una molécula compuesta de 50-100 monómeros y cada subunidad del FvW tiene sitios de unión para: Factor VIII, Glicoproteína plaquetaria Ib (GPIb), GP α Ib β 3, heparina y colágeno (fig.1), algunos de los cuales son dependientes de los cambios conformacionales generados por las fuerzas de cizallamiento (Siedlecki y cols 1996).

Una vez en circulación, los multímeros son sujetos a un proceso competitivo de liberación y proteólisis mediante ADAMTS 13 (a desintegrin-like and metalloprotease with thrombospondine type 13).

Defectos en la secreción o liberación intravascular del FvW pueden causar Enfermedad de von Willebrand (EvW), la cual es un conjunto heterogéneo de alteraciones hemorrágicas de origen genético, que implican alteración en la estructura, función o concentración del FvW, defectos en la formación de los multímeros o degradación proteolítica exagerada mediante ADAMTS 13 pueden causar EvW tipo 2A y contribuir a la EvW tipo 2B, la deficiencia total del FvW genera EvW tipo 3, clínicamente se caracterizan por presentar tiempo de sangrado prolongado, niveles bajos de Facto VIII Coagulante (FVIII:C), del FvW y del cofactor de ristocetina. (Rodeghiero y cols. 2002)

Por otro lado defectos en la proteólisis del FvW pueden ocasionar púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), una vez en circulación el FvW tiene una vida media de 12-20 horas, al mismo tiempo los multímeros demasiado grandes son convertidos en elementos más pequeños, mediante la acción de la ADAMTS 13, que corta el FvW en el sitio $\text{Tir}^{1605}\text{-Met}^{1606}$, mediante su unión al dominio A2, cuando la ADAMTS 13 está ausente o deficiente, circulan en sangre FvW de muy elevado peso molecular. (Sadler 2008)

La importancia fisiopatológica del FvW no está limitada los distintos tipos del EvW o a PTT, los niveles de FvW también se correlacionan con riesgo de trombosis y con riesgo de sangrado dentro de población aparentemente sana. (Saldler 2005) (Figura 3)

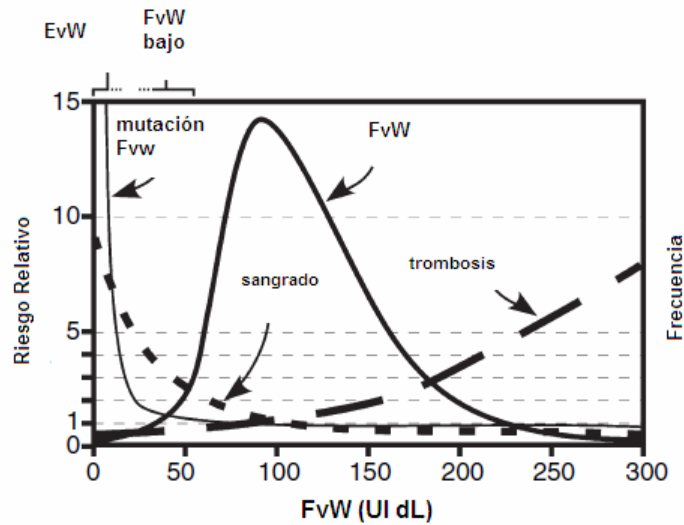


Figura 3. Riesgo de trombosis y hemorragia en relación a los niveles del FvW. La línea continua gruesa indica la frecuencia de distribución de los niveles del FvW, el 95% de la población tiene niveles entre 50 IU dL-200 IU dL. También se muestra el riesgo relativo (línea punteada) de sangrado, trombosis (línea punteada gruesa) y mutaciones dentro del gen del FvW (línea delgada continua)

2.4. El FvW y el Síndrome Coronario Agudo

El FvW se ha encontrado elevado en diferentes estadios de daño endotelial por lo que se le ha propuesto como un marcador del mismo. (Blann y cols, 1992).

La Enfermedad Cardiovascular isquémica presenta una alta prevalencia en nuestro país y representa la principal causa de muerte en países industrializados, de igual manera las enfermedades isquémicas del corazón, representan la principal causa de mortalidad general en nuestro país. (INEGI 2008).

Las enfermedades cardiovasculares tromboembólicas son el prototipo de estudio para la utilización de la determinación plasmática del FvW. El FvW aparentemente se relaciona con un aumento del riesgo de reinfarcto y muerte en pacientes con angina de pecho y en aquellos que ya han sufrido un reinfarcto. En un estudio prospectivo de seguimiento con 124 pacientes que vivieron después de un infarcto del miocardio se encontró que los niveles de FvW fueron factores de

riesgo independientes para reinfarto y muerte. (Jasson y cols 1991). Por lo tanto, es plausible que la utilidad principal de las cantidades elevadas plasmáticas de FvW sea la predicción de complicaciones como infarto miocárdico y muerte, así como eventos agudos; es posible también determinar el riesgo y el pronóstico en el uso de antitrombóticos. (Vischer 2006)

El Síndrome Coronario Agudo se define como un conjunto de manifestaciones de Cardiopatía Isquémica, que clínicamente se puede manifestar con Angina de pecho, Infarto Agudo del Miocardio o Muerte Cardíaca Súbita.

Los síndromes coronarios agudos comprenden un espectro de la enfermedad coronaria isquémica que va desde la angina inestable hasta el infarto miocárdico agudo. Actualmente estos síndromes se clasifican en infarto con elevación del segmento ST y sin elevación del segmento ST (infarto miocárdico agudo sin elevación del segmento ST y angina inestable), dividiéndose este último en riesgo alto, intermedio y bajo. (Branwald 2003)

2.5. Angina Estable

Este síndrome es secundario a una isquemia miocárdica transitoria, principalmente debida a un proceso obstructivo de las arterias coronarias (las manifestaciones clínicas aparecen por lo regular cuando existe una estenosis mayor al 70%). El principal factor de riesgo para cardiopatía isquémica es la aterosclerosis. Cuando las arterias coronarias son normales éstas se encargan de la regulación del flujo sanguíneo en respuesta a los cambios en el consumo miocárdico de oxígeno, cuando la demanda miocárdica de oxígeno incrementa, (por ejemplo en el ejercicio) las arterias coronarias incrementan su diámetro para proveer un adecuado flujo, esta autorregulación requiere la presencia de un endotelio vascular sin alteraciones, esta vasodilatación es mediada a través de metabolitos como la adenosina, acidosis, disminución de la presión parcial de oxígeno y elevación de los niveles de dióxido de carbono, entre otros. Cuando las

estenosis coronarias son mayores al 70%, el flujo coronario disminuye en 90% a pesar de existir una máxima vasodilatación coronaria. Durante las situaciones que aumentan las demandas miocárdicas de oxígeno, las arteriolas coronarias no pueden aumentar aún más su grado de vasodilatación, lo cual genera una limitación del flujo arterial en relación a las necesidades miocárdicas. Las estenosis mayores al 90% pueden originar isquemia aun en reposo. (Abrams 2005).

2.6. SICA I: Infarto Agudo miocárdico con elevación del segmento ST (IAM CESST)

El infarto miocárdico agudo tiene su origen en la fractura o erosión de una placa aterosclerótica en las arterias coronarias, lo cual inicia la cascada de la coagulación culminando en la formación de un trombo coronario oclusivo. Cuando la oclusión persiste, la manifestación electrocardiográfica será una elevación del segmento ST en las derivaciones correspondientes a las áreas cardiacas afectadas. La oclusión coronaria inicia una onda de necrosis miocárdica que se extiende desde el endocardio y en dirección hacia el epicardio. (Hahn 2006)

Placa vulnerable o inestable. Son las placas ateroscleróticas con mayor susceptibilidad a la rotura, las cuales se caracterizan por tener un centro lipídico de gran tamaño, cubierto por una delgada capa de tejido fibroso. Al fracturarse o erosionarse la placa aterosclerótica se activa la cascada de la coagulación. Uno de los primeros eventos en ocurrir es la activación, adhesión y agregación plaquetaria por medio del Factor von Willebrand, glicoproteína $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ y la producción de tromboxano A₂, serotonina, epinefrina y factor activador de las plaquetas. Una vez activadas las plaquetas, éstas adquieren gran afinidad por la trombina y el fibrinógeno. La primera es convertida a trombina, la cual se encarga de convertir el fibrinógeno en fibrina. Una vez que una gran cantidad de fibrina se forma la matriz de fibrina, que actúa como una red, que captura plaquetas y eritrocitos que forman el trombo plaquetario. La fibrina en este trombo adquiere una alta afinidad por el plasminógeno (forma inactiva de la plasmina), cuya función

principal es la lisis de la red de fibrina, y con ello la destrucción del trombo. La conversión del plasminógeno a plasmina es llevada a cabo por el activador tisular del plasminógeno. (Sura 2006)

2.7. SICA II: Infarto agudo miocárdico sin elevación del segmento ST (IAM SESST) y angina inestable

Un trombo coronario oclusivo se manifestará electrocardiográficamente con una elevación aguda del segmento ST (≥ 1 mm), la cual evolucionará a una onda Q en la mayoría de los pacientes (infarto miocárdico con elevación del segmento ST). Por otra parte, los pacientes que cursen con una obstrucción trombótica incompleta o intermitente se manifestarán electrocardiográficamente como una depresión del segmento ST (> 5 mm) o una inversión dinámica de la onda T (infarto agudo miocárdico sin elevación del segmento ST), la mayoría de estos pacientes no desarrollara onda Q. (Yang 2006)

Por definición los síndromes coronarios sin elevación del segmento ST (IAM SESST) no debe tener elevación del segmento ST; sin embargo, los cambios en el electrocardiograma son variados. Los síndromes coronarios agudos representan un estado dinámico en el que cualquier momento puede pasar de una categoría a otra. Si las enzimas miocárdicas no se elevan, se considerará como una angina inestable; si se elevan el diagnóstico será de infarto miocárdico agudo sin elevación del ST. (Branwald 2003)

Estudios clínicos prospectivos han sugerido que los niveles plasmáticos elevados de FvW predicen la ocurrencia de eventos clínicos mayores como infarto o muerte, esto probablemente se deba a que el valor de FvW en plasma es un indicador de la extensión del daño en el endotelio vascular (Mannuccio y cols, 1998).

Los niveles plasmáticos del Factor von Willebrand se encuentran elevados en los pacientes con riesgo cardiovascular (Paulinska y cols, 2009).

En las oclusiones coronarias agudas el FvW participa en el trombo que se forma y está íntimamente ligado a las plaquetas, esto debido a que el FvW se une a las plaquetas en presencia de un ambiente turbulento característico de la enfermedad arterial (Hoshiba y cols 2006). El FvW muestra patrones característicos en plasma, que alcanzan su máximo tres o cuatro días después del evento agudo (Mannuccio 1998)

De igual manera varios estudios sugieren que el riesgo de trombosis se correlaciona con los niveles del FvW, hay varios estudios que sugieren que el riesgo de ictus tromboembólico, IAM y muerte se duplican 1.2 por cada 20 UI de incremento del FvW. (Conway y cols. 2003)

Durante un episodio de oclusión coronaria aguda o angina inestable el nivel de FvW se incrementa, alcanzando un pico a las 48-72 h y este incremento es predictivo para eventos adversos en los siguientes 30 días (Spiel y cols 2008), posteriormente se aprecia una disminución del FvW después de una trombolisis exitosa (Montalescot y cols 1998).

Hay estudios que muestran concentraciones elevadas del FvW en pacientes con Infarto Agudo Miocárdico (IAM), de tal modo que existe una relación bien establecida entre el FvW y el riesgo de desarrollo de IAM en pacientes con enfermedad cardiovascular, lo cual es corroborado por numerosos estudios que describen una asociación del FvW y el riesgo de reinfarto y muerte (Thompson y cols 1995), además los pacientes con IAM tienen niveles más elevados de FvW comparado contra pacientes que solamente tienen Angina de Pecho (Frossard y cols 2004).

La evaluación combinada de FvW y troponina I, en este grupo de pacientes ha proporcionado información sobre el pronóstico a largo plazo: niveles elevados del

FvW y/o niveles elevados de troponina I se encuentran asociados significativamente con un incremento en la muerte, IAM, y angina recurrente (Frossard y cols 2004).

Estudios recientes proveen evidencia de que el FvW es predicativo del grado de necrosis miocárdica, flujo sanguíneo miocárdico y eventos adversos en pacientes con Síndromes Coronarios Agudos (SCA) (Montalescot y cols 2000).

Tomando en cuenta la importancia del FvW en la formación del trombo, los recursos terapéuticos dirigidos a inhibir de manera específica al FvW están siendo propuestos como nuevos agentes antiplaquetarios (Diener y cols 2009).

Los estudios que examinan la relación entre el FvW y la trombosis comienzan a identificar al FvW como un mediador de la enfermedad, la relación existente entre los niveles elevados del FvW y los eventos coronarios tienen una asociación independiente, lo cual sugiere que el FvW desempeña un papel directo en la oclusión aguda coronaria por lo que los antagonistas del FvW han sido propuestos como novedosos agentes antiplaquetarios (Laffan y cols 2009).

El FvW es un útil marcador clínico, relacionado con la incidencia y pronóstico del síndrome Coronario Agudo, así como también existe una correlación significativa entre los niveles de FvW y el desarrollo de ictus. Sin embargo ninguna de las intervenciones terapéuticas actuales para IAM se dirige hacia el FvW. Por lo que los antagonistas del FvW pueden representar una novedosa y útil aportación al conocimiento de los agentes antitrombóticos (Ruggeri y cols 1992).

La electroforesis en geles de poliacrilamida con Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) es el método analítico más utilizado para separar los componentes de una mezcla de proteínas (Rosenberg 1996). La metodología del SDS-PAGE,

nos permite estudio el tamaño y peso molecular de una proteína a través de su movilidad electroforética a través una matriz porosa. (Scopes 1994)

La utilidad de este sistema se basa en el uso de un sistema de soluciones amortiguadoras discontinuas que hace posible que la muestra y la solución amortiguadora del gel de corrimiento sean diferentes en su composición, (Tris-HCl/Tris-glicina, pH 6.8/8.3) (Ornstein 1964) lo cual permite que se pueda cargar un volumen mayor de muestra, manteniendo una adecuada resolución debido a que las proteínas son concentradas en bandas delgadas antes de entrar al gel de resolución. El uso agentes reductores como el SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) también ha sido una herramienta útil, ya que el SDS se une a las proteínas generando una unidad con carga negativa similar para todas las proteínas. (Shapiro 1969) La electroforesis de proteínas en geles de agarosa es una alternativa diferente al uso de geles de poliacrilamida que ofrece varios beneficios, los geles se pueden correr usando sistema horizontal o vertical, permiten separar eficazmente proteínas tan grandes como 600, 000 KDa, es fácil de preparar y manejar, ofrece una recuperación eficiente de proteínas, las proteínas obtenidas se pueden utilizar para inmunizar directamente animales para la obtención de anticuerpos y lo más importante es que no es tóxica.

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de agarosa recomendadas separar proteínas de alto peso molecular.

Tamaño de proteína (KDa)	Concentración
20-200	5%
150-300	3%
300-600	2%
600-1000	1.5%
1000-5000	2%

Los primeros métodos para analizar la estructura multimérica del FvW utilizaban la metodología descrita por Lämmler en 1970, con la excepción de que utilizaban geles de agarosa, debido a que el FvW es demasiado grande para entrar en los geles de poliacrilamida (Ruggeri, Zimmerman 1980), técnica que ha tenido múltiples modificaciones debido a que utilizaba material radioactivo.

3. JUSTIFICACION:

La Enfermedad Cardiovascular isquémica presenta una alta prevalencia en nuestro país y representa la principal causa de muerte en países industrializados. Se ha demostrado que los niveles elevados de FvW representan un mayor riesgo de desarrollo de eventos adversos incluyendo la muerte en este grupo de pacientes, la tendencia actual de los nuevos antiplaquetarios se dirige a bloquear los receptores específicos del FvW, por lo que un mayor conocimiento de la estructura molecular de esta proteína es de gran importancia. Nuestro estudio pretende estudiar si existen diferencias en la estructura multimérica del FvW de pacientes con enfermedad cardiovascular.

4. HIPÓTESIS:

Los pacientes con enfermedad cardiovascular presentan un estado de sangre vulnerable constante condicionado por la presencia de concentraciones elevadas del FvW y la presencia de multímeros de elevado peso molecular del mismo.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo General

Estudiar la composición multimérica y los niveles plasmáticos del FvW en pacientes con enfermedad cardiovascular

5.2. Objetivos Específicos:

- Estandarización de la metodología para la evaluación de la estructura Multimérica por electroforesis en gel de agarosa.
- Reproducción de la metodología para evaluación de la estructura multimérica por electroforesis en gel de poliacrilamida/agarosa.
- Análisis de la estructura multimérica del FvW en pacientes con SCA.
- Determinar si existen diferencias estructurales tales como la presencia de multímeros ultra-largos del FvW que favorezcan un estado protrombótico.
- Determinación de los niveles plasmáticos del FvW.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.1 Tipo de estudio: Prolectivo, transversal.

6.1.2 Sitio del estudio:

- Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
UMSNH
 - Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular
- Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva”
 - Unidad de Hemodinámica
- Instituto de Investigaciones Químico Biológicas UMSNH

- Laboratorio de Farmacología

6.1.3 Material Biológico

Se estudiaron las muestras plasmáticas de 30 pacientes con diagnóstico de Cardiopatía isquémica que ingresaron a la sala de Hemodinámica del Hospital General de Morelia “Dr. Miguel Silva”, en un período comprendido entre Diciembre del 2009 a Diciembre del 2010. Además 20 personas sanas, donadores de sangre del Centro Estatal de Transfusión Sanguínea que se consideraron grupo control y la muestra de un paciente con Púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) como control de MAPM.

La edad promedio de los pacientes con diagnóstico de Cardiopatía isquémica que participaron en el estudio fue 61 años, con un mínimo de 35 años y un máximo de 77 años. Los individuos sanos fueron donadores de sangre cuya edad media fue de 34 años con un mínimo de 20 años y un máximo de 56.

6.1.4 Equipo

- Cámara para electroforesis vertical (Biorad Mini-protean system)
- Fuente de poder para electroforesis (Power pac HC Biorad 250V/30A/300W)
- Equipo de transferencia en semi-seco (Biorad Transblot SD semi-dry transfer cell)
- Cámara de transferencia submarina Biocom (Complete omniPAGE Mini system for Vertical Electrophoresis & Electroblotting) (BCVS10CBS)
- Cassete de revelado 8X Kyokko Green

6.2 MÉTODOS

De todos los pacientes que ingresaron a la sala de Hemodinamia con diagnóstico de Cardiopatía Isquémica, se obtuvo una muestra de sangre mediante la punción arterial (radial o femoral) al momento de la Intervención Coronaria Percutánea (ICP), para la obtención de plasma a partir del cual se llevó a cabo la determinación del FvW:Ag y estudio de los multímeros del FvW.

6.2.1. Obtención de la muestra

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción arterial (radial o femoral) realizada para el acceso vascular de la Intervención Coronaria Percutánea (ICP), la sangre se colocó en 2 tubos con anticoagulante citrato de sodio al 3.8%. Se obtuvieron 4.5 ml de sangre en cada tubo, mezclando suavemente para evitar la formación de espuma; posteriormente la sangre se centrifugó 1500 rpm durante 10 minutos para obtener en plasma sobrenadante. Se hicieron alícuotas de 0.5 ml a partir del plasma, las cuales se almacenaron a -70° C hasta su estudio.

6.2.2. Métodos Inmunológicos

6.2.2.1. Determinación del FvW mediante ELISA

Se preparó la solución de lavado y la solución de la muestra de acuerdo al instructivo incluido en el paquete comercial Imubind vWF Elisa Kit. Posteriormente se reconstituyeron los estándares de proteína con 1 ml de agua destilada para obtener las concentraciones de 0.5 mU/mL, 1 mU/mL, 2 mU/mL, 5 mU/mL y 10 mU/mL, y 2 ml de agua destilada para el estándar de 0 mU/mL.

Se diluyeron las muestras de plasma 1:100 con la solución para la muestra, posteriormente se agregaron 100µL por cada pozo, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron 4 lavados con la solución de lavado (250 µL por cada lavado). Se preparó el anticuerpo 1:100, se colocaron 100 µL en cada

pozo, se incubo durante 1 hora a temperatura ambiente, se nuevamente realizaron 4 lavados. Se agregaron 100 µL de substrato, se incubo durante 18 minutos a temperatura ambiente, finalmente se agregaron 50 µL de solución de paro (H_2SO_4 0.5 M), se evaluó con una absorbancia de 450 nm.

6.2.3. Estudio de los multímeros del FvW

Para el estudio de los multímeros del FvW se realizaron 2 técnicas, la primera fue una reproducción de una técnica de electroforesis con geles de poliacrilamida al 3% para el gel separador y de poliacrilamida al 2% y agarosa al 0.8% para el gel de resolución. La segunda fue una estandarización para la electroforesis vertical en geles de agarosa-SDS para el análisis del FvW.

Una vez estandarizadas ambas técnicas, se procedió a transferir los multímeros de FvW a membranas de PVDF, mediante transferencia submarina 120 V durante 1 hora y mediante transferencia en semiseco a 300 mA durante 1 hora, para probar así la efectividad de ambas metodologías para la transferencia de multímeros de alto peso molecular. Posteriormente las membranas fueron analizadas con el anticuerpo anti-FvW.

6.2.3.1 Electroforesis del FvW en geles de poliacrilamida 3%-agarosa 0.8% con Dodecil sulfato de sodio (sds-page)

La electroforesis del Factor von Willebrand se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli de un sistema discontinuo de reguladores (Laemmli, 1970).

Los geles se prepararon mezclando las soluciones indicadas en el apéndice, el gel concentrador contenía 3% de acrilamida-bis acrilamida y el gel de resolución contenía agarosa al 0.8% y acrilamida-bis acrilamida al 2%. Para

preparar los geles primero se montaron las placas de vidrio de la cámara para electroforesis vertical (Biorad Mini-protean system) con una separación de 1 mm, posteriormente se vació la mezcla para formar el gel de resolución en la cámara, hasta una altura de 5 cm, inmediatamente después y antes de que el gel polimerizara, se colocó sobre ella una capa de butanol saturado con agua con el propósito de linearizar la superficie. Se dejó gelificar durante una hora, se eliminó el exceso de butanol lavando con agua corriente y se secó la superficie del gel con papel filtro para posteriormente colocar el gel concentrador. Inmediatamente después se colocó un peine de 10 pozos para formar los pozos. Una vez preparado el gel se llenó la cámara de electroforesis con regulador de corrimiento.

Las muestras de plasma se diluyeron utilizando la solución de dilución de la muestra (SDM Tris 0.01 M, EDTA 0.001 M, Urea 8M, SDS 2%), colocando en un tubo Eppendorf 80 μ l de SDM, 20 μ l de plasma y 10 μ l de azul de bromofenol al 0.05%. Se colocaron 15 μ l de muestra diluida en cada pozo.

El corrimiento electroforético se realizó con una corriente constante de 15 mA por gel para concentrar las muestras y luego en el gel de resolución se aumentó la corriente a 25 mA por gel.

6.2.3.2. Electroforesis en Geles de Agarosa con SDS

Se utilizó una cámara para electroforesis vertical (Biorad Mini-protean system) Los cristales de la cámara fueron lavados con agua destilada, enjuagados con etanol al 90%, secados y posteriormente se ensamblaron y montaron utilizando separadores de 1 mm. Se probaron varios tipos de agarosa, finalmente se utilizó agarosa tipo V de la marca Sigma, se probaron varios porcentajes de concentración, alcanzando una concentración final de agarosa al 1.3% para el gel de corrimiento (100 mmol/L Tris base, 0.4% SDS, pH 8.8, HCl).

Se calentó la agarosa hasta que comenzó a ebulir, se utilizó una micropipeta de 5 mL para vaciar el gel, en una sola emisión y así evitar la formación de burbujas y se vació a los cristales previamente armados hasta un nivel 1.5 cm por debajo del límite superior de los cristales, inmediatamente después se agregó butanol saturado con agua para linearizar la superficie, una vez que el gel solidificó se enjuagó el butanol con agua corriente y se seco con papel filtro. Una vez que gelificó la agarosa se agregó el gel concentrador con agarosa al 1% (70 mmol/L Tris base, 4 mmol/L EDTA, 0.4% SDS, pH 6.8). Se colocó el peine para formar los pozos con una profundidad de 1 cm y se dejó gelificar durante 30 minutos en condiciones refrigerantes.

Preparación de la muestra

El plasma obtenido se diluyó 1:5 con una Solución de Dilución de la Muestra (70 mmol/L Tris, 4 mmol/L EDTA, 9mmol/L urea, 83.22 mmol/L SDS, pH 6.8), se agregó 10 µL de azul de bromofenol y 10 µL de glicerol, finalmente se incubo a 95° C durante 5 minutos.

Electroforesis

Se retiro el peine separador del gel concentrador de manera cuidadosa, para evitar la ruptura de los pozos, se lleno la cámara de electroforesis con solución de electroforesis (50mM Tris, 384mM glicina 0.1% SDS, pH 8.3). Posteriormente se cargaron 15 µL de la muestra diluida con una jeringa marca Hamilton de 30 µL, y se inicio corrimiento a una corriente constante de 10 mA en condiciones refrigerantes hasta que el frente de corrimiento llegue al final del gel.

Inmunoelectrotransferencia (Western blot)

Una vez estandarizada la técnica de electroforesis se prosiguió a la electrotransferencia de los multímeros del factor a membranas de PVDF, la

electrotransferencia se llevó a cabo mediante transferencia submarina y transferencia en semiseco, para poder realizar una valoración de la eficacia de ambas metodologías en la transferencia de los multímeros de alto peso molecular MAPM característicos del FvW.

La electrotransferencia submarina se llevó a cabo colocando sobre la rejilla del equipo de electrotransferencia Complete omniPAGE Mini system for Vertical Electrophoresis & Electroblotting (BCVS10CBS) una esponja y un cuadro de papel filtro de tamaño ligeramente más grandes que el gel, previamente empapados en regulador de transferencia. Se colocó el gel y sobre éste la membrana de PVDF, previamente saturada con metanol, cortada al tamaño del gel evitando la formación de burbujas entre ellos, sobre la membrana se colocó otro papel filtro y una esponja empapados en regulador, se cerró la rejilla y se colocó en la cámara de electrotransferencia sumergiéndola en el regulador, verificando que el gel quedara orientado hacia el polo negativo y la membrana hacia el polo positivo. La transferencia se realizó a 120 V durante 1 hora en condiciones refrigerantes.

Transferencia en semiseco

Se utilizó un equipo de transferencia en semi-seco (Biorad Transblot SD semi-dry transfer cell) y se preparó una solución de transferencia (2.5 mmol/L Tris, 19.2 mmol/L glicina, 0.01% SDS, 20% metanol, pH 8.8). Se cortaron membranas de PVDF del mismo tamaño del gel, se hidrataron en metanol durante 5 minutos, posteriormente se almacenaron en solución de transferencia hasta su uso, así como también se hidrataron 2 fragmentos de papel filtro (Extra thick blot paper criterion Biorad) del mismo tamaño del gel en solución de transferencia.

Una vez que terminó el corrimiento el gel se colocó en solución de transferencia durante 15 minutos. Se armó un sándwich colocando un papel filtro, membrana PVDF, gel de agarosa y nuevamente un papel filtro y se inició la transferencia a 15 V, 300 mA durante 1 hora.

Estrategia de bloqueo y lavado

Una vez concluida la transferencia, se incubó la membrana en solución de leche descremada al 5% durante 1 hora, para bloquear los sitios inespecíficos, se realizó un lavado con TBS-T 0.15 M durante 5 minutos en agitación continua a temperatura ambiente, posteriormente se hizo un lavado con TBS-T 1M por 5 minutos en agitación continua y finalmente se realizó otro lavado con TBS-T 0.15 M en las mismas condiciones.

Inmunolocalización de los multímeros del FvW

Las membranas previamente bloqueadas y lavadas fueron incubadas con anticuerpo primario policlonal anti-FvW de conejo (Dako Cytomation AOO82) durante toda la noche a una dilución 1:3000 con TBS-T 0.15 M. Posteriormente se realizó un lavado con TBS-T 0.15 M durante 5 minutos en agitación continua a temperatura ambiente, posteriormente se hizo un lavado con TBS-T 1M por 5 minutos en agitación continua y finalmente se realizó otro lavado con TBS-T 0.15 M en las mismas condiciones.

Se incubó durante 2 horas mezclando con el anticuerpo secundario (Swine Anti-Rabbit HRP Dako Cytomation 0217) a una dilución 1:5000, se realizaron 2 lavados, TBS-T 0.15 M durante 5 minutos cada uno en agitación continua, a temperatura ambiente, 1 lavado de TBS-T 1M durante 5 minutos y finalmente otros 2 lavados con TBS-T 0.15 M en las mismas condiciones.

Revelado

En un área especial de revelado, se colocaron las membranas en solución de luminol Western Blotting Reagent Santa Cruz Biotechnology, en agitación continua durante unos segundos, una vez que el luminol cubrió toda la superficie de la membrana, se colocaron en un cassette especial de revelado 8X 10" Kyokko Green y sobre esta una placa especial de revelado (X Ray Film Fuji Medical)

cortada previamente al tamaño de la membrana, se dejó dentro del cassette durante 5 minutos y posteriormente se colocó en la Solución reveladora (Fujifilm X-Ray film developer rendor) durante 3 minutos, se escurrió, se pasó a la solución fijadora (Fujifilm X-Ray Film fixer renfix) durante 3 minutos y finalmente se colocaron las membranas en agua para enjuagar las soluciones previas y se dejó secar a temperatura ambiente, finalmente se observan las bandas radiolúcidas que representan los multímeros del FvW.

7. RESULTADOS

Se incluyó en el estudio a un total de 30 pacientes con Enfermedad cardiovascular: 26 hombres (86.6%) 4 mujeres (13.3%), con una edad promedio de 61 ± 10.3 años. En la tabla 1 se muestran los antecedentes personales patológicos del grupo de estudio y podemos apreciar que 14 (40%) tuvieron antecedente heredofamiliar de ECV, 20 (66.6%) hábito de tabaquismo, 2 (6.66%) antecedente personal de tabaquismo, 11 (36.6%) con diagnóstico de DM, 19 (63.3%) con Hipertensión Arterial y 22 (73.3%) de dislipidemia aterogénica. Los diagnósticos establecidos después de la Intervención Coronaria Percutánea fueron: 19 (63.3%) con diagnóstico de Infarto Agudo del Miocardio y 11 (36.6%) con diagnóstico de Angor Inestable.

Tabla 1. Antecedentes personales patológicos del grupo de estudio.

Antecedente	n (%)
ECV	14 (40%)
Tabaquismo	20 (66.6%)
DM	11 (36.6%)
Hipertensión Arterial	19 (63.3%)
Dislipidemia	22 (73.3%)

Se analizaron muestras plasmáticas de los pacientes para la determinación de FvW. En la tabla 2 se presentan los valores medios obtenidos para las pruebas inmunológicas: concentración del factor de von Willebrand y estudio de los multímeros del FvW, en la determinación del FvW mediante ELISA se encontró una concentración de 21.13 ± 4.76 $\mu\text{U/mL}$ en el grupo de estudio, los pacientes con diagnóstico de IAM presentaron una media en la concentración del FvW de 23.60 ± 7.79 $\mu\text{U/mL}$ y el grupo con Angor Inestable 16.88 ± 3.07 $\mu\text{U/mL}$, mientras que el grupo control presentó una concentración 6.1 $\mu\text{U/mL}$ y el control de MAPM

7.8 $\mu\text{U/mL}$, como se puede apreciar la concentración de FvW es significativamente mayor en los pacientes con IAM ($p < 0.001$). En el estudio de los multímeros del FvW vemos la distribución del grupo de estudio, coincide con el control de MAPM.

Tabla 2. Valores medidos obtenidos de las pruebas inmunológicas en la población estudiada

Estudio	Control sano	Control MAPM	IAM	AI
FvW	6.1 $\mu\text{U/mL}$	7.8 $\mu\text{U/mL}$	23.60 $\mu\text{U/mL}$	16.88 $\mu\text{U/mL}$
Estudio de multímeros del FvW	Distribución normal	Distribución con predominio de MAPM	Predominio con MAPM	Predominio de MAPM

El estudio de los multímeros del FvW se llevó a cabo mediante dos técnicas de inmunoelectrotransferencia (IET), la primera fue una metodología mixta en geles de poliacrilamida y agarosa; la segunda fue una estandarización de una electroforesis en geles de agarosa, mediante las dos metodologías se obtuvieron dos patrones electroforéticos diferentes, los cuales se pueden apreciar en la siguiente figura:

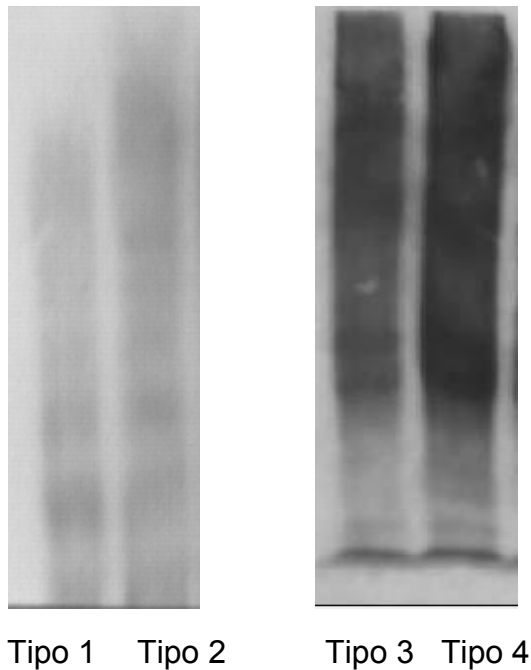


Figura 4. Patrón electroforético de los multímeros del FvW que se presento en la población estudiada. El patrón tipo 1 y 2 corresponden a la electroforesis en geles de agarosa con SDS, el tipo 1 corresponde la distribución normal del FvW y el 2 a FvW con predominio de MAPM. Los patrones electroforéticos 3 y 4 corresponden a los observados en electroforesis en geles de acrilamida agarosa, el tipo 3 corresponde a la muestra con MAPM y el tipo 4 a la distribución normal.

- a) Patrón electroforético 1. Pool de plasmas normales. Aparece la distribución normal de los multímeros del FvW, que se observa en la electroforesis en geles de agarosa con SDS, el cual ofrece una clara distribución del patrón de bandeo.
- b) Patrón electroforético 2. Plasma de paciente isquémico. En este patrón de bandeo se observa un predominio claro en la parte superior cerca del punto de colocación de la muestra correspondiente a los MAPM, seguido de las bandas que corresponden a los multímeros de bajo peso molecular, este es el patrón de bandeo que ofrece la electroforesis en geles de agarosa con SDS.

- c) Patrón electroforético 3. Este es el patrón de bandeo que ofrece la metodología de electroforesis en geles de acrilamida agarosa, se aprecia la distribución normal de los multímeros del FvW.
- d) Patrón electroforético 4. Es la distribución característica de los MAPM en la electroforesis en gel de acrilamida agarosa, y con predominio de MAPM, donde se aprecia un manchón amplio en la parte superior correspondiente a los MAPM.

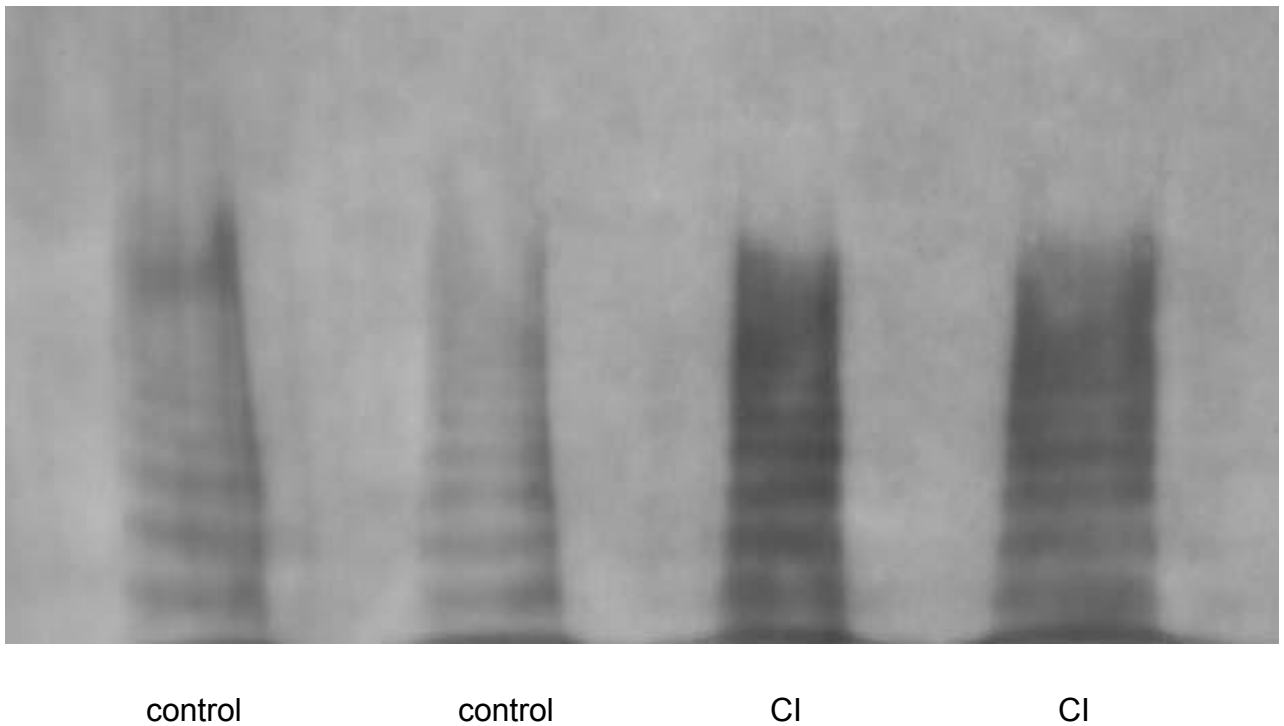
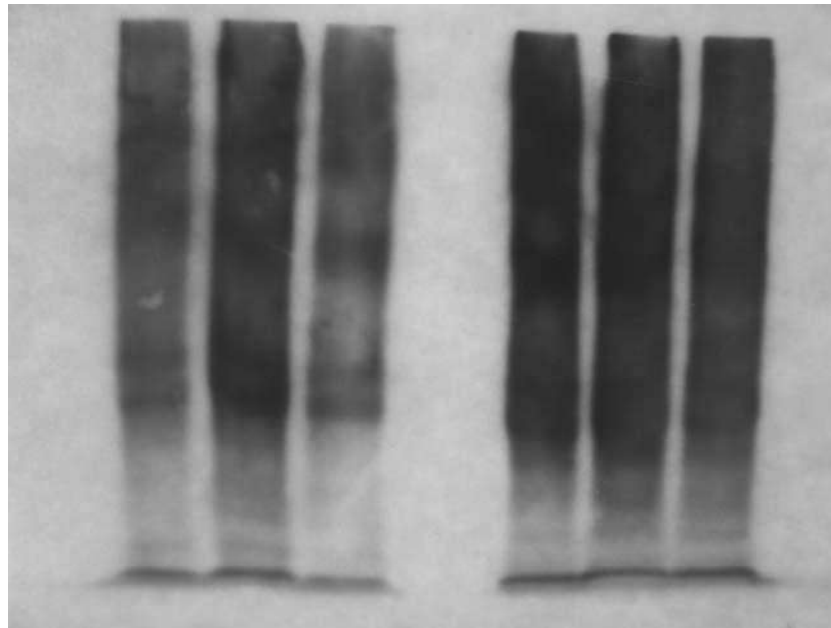


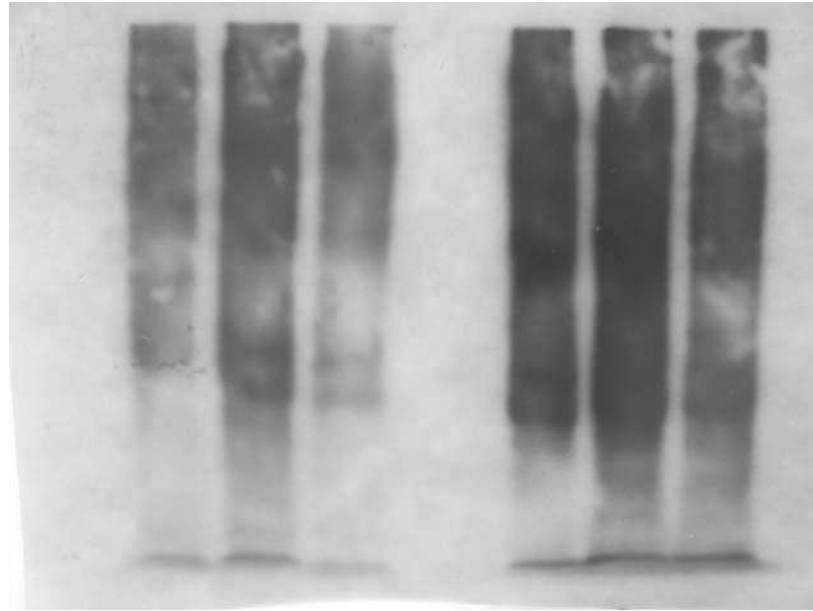
Figura 5. Patrón electroforético obtenido en la electroforesis en geles de agarosa con SDS, en los individuos sanos, y en los individuos con CI



Grupo Control

Cardiopatía isquémica

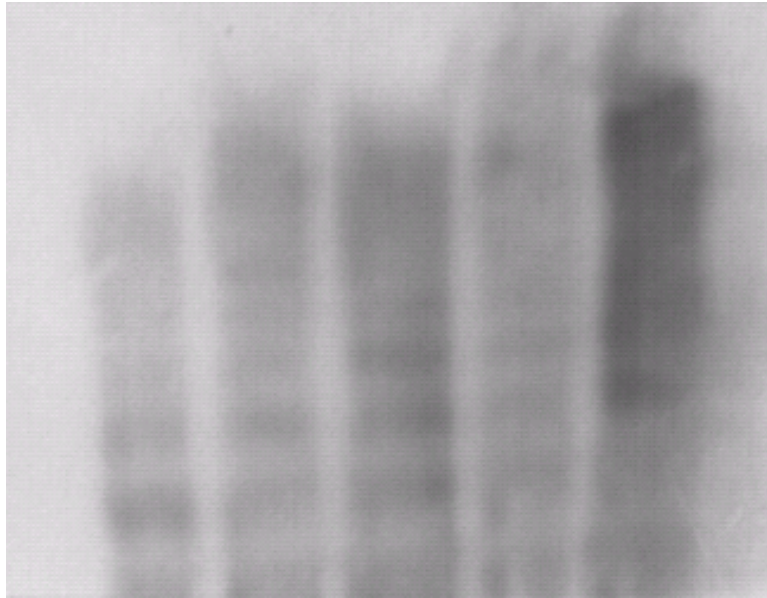
Figura 5. Patrón electroforético característico de la electroforesis en geles de poliacrilamida/agarosa (SDS-PAGE) en grupo control y en pacientes con cardiopatía isquémica, tipo de transferencia: semi-seco



Grupo Control

Cardiopatía isquémica

Figura 6. Patrón electroforético del FvW en individuos sanos y en pacientes CI, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida/agarosa (SDS-PAGE), tipo de transferencia: submarina.



1 2 3 4 5

Figura 7. Patrón electroforético del FvW realizado mediante electroforesis en geles de agarosa y transferencia submarina en distintas entidades clínicas: 1 sujetos sanos, 2 Púrpura Trombótica Trombocitopénica (con mayor presencia de MAPM), 3 Infarto Agudo del Miocardio, 4 Angor Inestable, 5 Fibrilación Auricular.

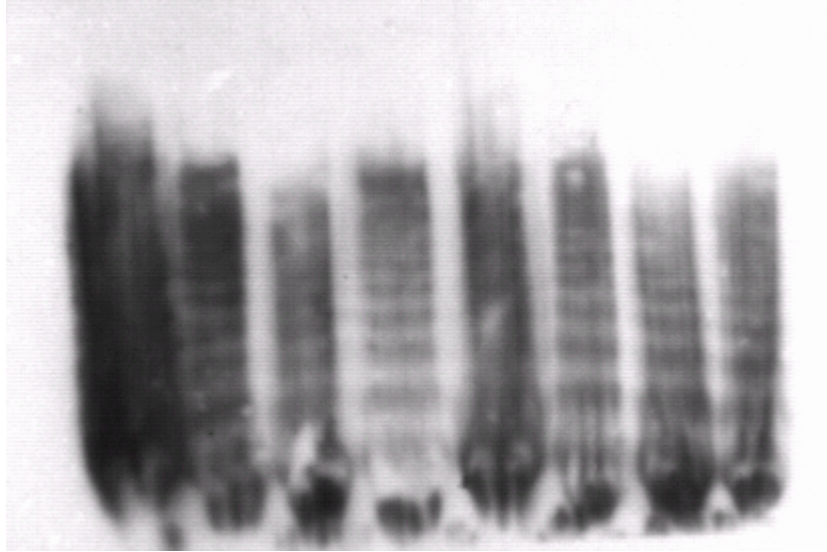


Figura 8. Patrón electroforético de pacientes Cardiopatía Isquémica, realizado mediante electroforesis en geles de agarosa y transferencia semi-seco.

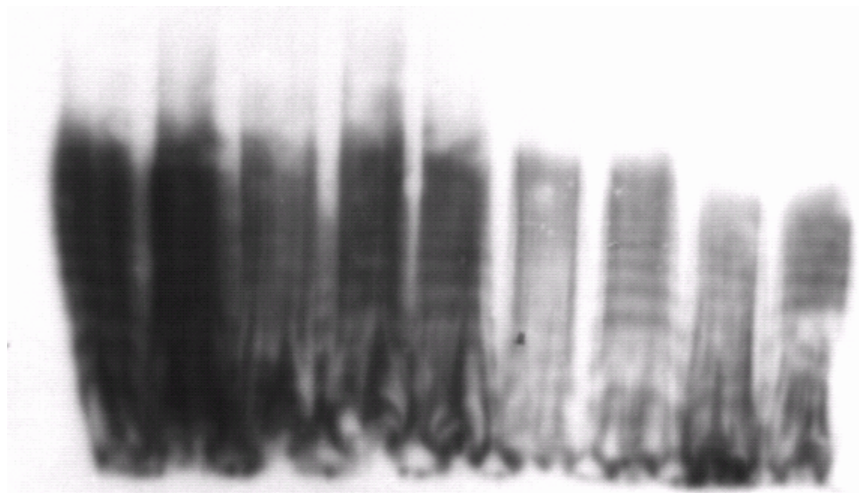


Figura 9. Patrón electroforético de pacientes Cardiopatía Isquémica, realizado mediante electroforesis en geles de agarosa y transferencia submarina.

En la figura 5, se aprecia el patrón electroforético obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa con SDS y transferencia submarina en individuos sanos y en pacientes con cardiopatía isquémica, mientras que en la figura 5 y 7 se aprecia el patrón electroforético de las mismas muestras procesadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida/agarosa, realizando una transferencia en semi-seco en la figura 5 y semi-seco en la figura 6.

En la figura y se aprecia claramente la diferencia entre el patrón electroforético entre individuos sanos, Púrpura trombótica trombocitopénica, Infarto Agudo del Miocardio (IAM), Angor Inestable (AI) y Fibrilación Auricular (FA), procesadas mediante electroforesis en geles de agarosa y transferencia semi-seco. Los Pacientes con IAM y AI presentan MAPM casi en la misma proporción que el paciente con PTT, mientras que el paciente con FA muestra un mayor predominio de MAPM que el resto de las muestras.

En las figuras 8 y 9 se aprecia el patrón electroforético de pacientes con Cardiopatía isquémica (Infarto Agudo del Miocardio sin elevación del ST, Angor Inestable).

8. DISCUSION

Analizando la población de pacientes con Cardiopatía isquémica, se pudo observar que los individuos del grupo de estudio presentaron concentraciones más elevadas de FvW comparados con el grupo control ($p < 0.001$), así mismo se observó una diferencia significativa entre los individuos que presentaron Infarto Agudo del Miocardio y Angor Inestable ($p < 0.001$), información que coincide con la proporcionada por Spiel y cols en donde concluyen que el FvW desempeña un papel fundamental en la predicción de eventos cardiovasculares adversos incluyendo la muerte. (Spiel y cols 2008).

Uno de los objetivos de la presente tesis fue estandarizar una metodología para la electroforesis en geles de agarosa, para analizar los multímeros del FvW y comparar los resultados obtenidos con el patrón electroforético proporcionado por otra metodología mixta de acrilamida/agarosa, para establecer las ventajas y desventajas de ambas metodologías.

La electroforesis en geles de acrilamida es la metodología de elección para el análisis de proteínas (Rosenberg), sin embargo cuando se trata de proteínas de alto peso molecular, su utilidad disminuye, ya que las concentraciones de acrilamida necesarias para permitir el paso de tales proteínas son tan bajas que la consistencia del gel lo hace prácticamente imposible de manejar; sin embargo, la incorporación de agarosa a dichos geles de acrilamida a bajas concentraciones, permite realizar esta metodología, brindando varias ventajas entre las que destacan: permite una separación clara de bandas, es fácilmente reproducible y la carga de las muestras en el gel es más sencillo debido a que los pozos quedan muy bien formados y diferenciados, sin embargo las desventajas consisten en que se trata de una técnica de mayor dificultad, pues es necesario controlar perfectamente las condiciones para lograr la polimerización tanto de la acrilamida como la gelificación de la agarosa. Por

otra parte la toxicidad de la acrilamida hace deseable contar con una metodología en geles exclusivamente de agarosa.

Por su parte, la electroforesis de proteínas en geles de agarosa, es una metodología que es de gran utilidad cuando se trata de proteínas de alto peso molecular (Cambrex), la principal dificultad que enfrenta es cuando se realiza electroforesis vertical debido a que este tipo de equipos no son los mas indicados para este tipo de reactivo y al momento de preparar el gel este se puede romper o deslizar con mucha facilidad, saliendo incluso de la cámara de electroforesis, los pozos resultan irregulares por lo que es necesario cargar las muestras con sumo cuidado para evitar la contaminación de los carriles vecinos. Su principal ventaja es que no se trata de un reactivo tóxico y es de fácil manejo.

En cuanto al patrón electroforético que brindan ambas metodologías, la electroforesis en geles de agarosa brinda un patrón de bandeo muy claro y definido cuando se trata de MAPM, mientras que la electroforesis en geles de poliacrilamida y agarosa solamente brinda un patrón de barrido que varía en su intensidad cuando están presentes los MAPM. Los multímeros de bajo peso molecular son fácilmente observados con cualquiera de las dos metodologías. Las bandas que se logran apreciar en los geles de poliacrilamida y agarosa son más finas, no obstante las bandas que se aprecian en los geles de agarosa también son claras.

Respecto a las metodologías de transferencia, tanto la transferencia submarina como la transferencia semiseca son de utilidad para la transferencia de los MAPM, sin embargo la electroforesis submarina es una metodología conlleva un mayor grado de dificultad debido a la facilidad con que se pueden formar burbujas entre las esponjas, las cuales resultan en patrones de bandeo manchados y de baja calidad, sin embargo, ofrece la ventaja de poder realizarse en condiciones refrigerantes, situación que es favorable para

este tipo de transferencia. (Helmunt 2010), no obstante los multímeros del FvW de alto peso molecular se transfieren también con equipo semi-seco. Con esta técnica, se obtuvieron impresiones de los patrones de bandeo más claras, con menos manchas y más nítidas, por lo que esta técnica sería más recomendada para impresiones de calidad o para análisis posterior mediante densitometría.

En cuanto a los patrones de bandeo entre los grupos de estudio, se observó presencia de MAPM en el grupo de los pacientes con Cardiopatía isquémica, el patrón de bandeo de estos individuos es muy similar al que presenta la muestra con PTT, padecimiento en el cual se tiene un exceso de MAPM que genera un estado trombótico, producido por la deficiencia de la enzima ADAMTS-13, responsable de controlar en el plasma el tamaño de los multímeros del factor, esta situación favorece un estado de sangre vulnerable, que contribuye al desarrollo de complicaciones trombóticas en este tipo de pacientes.

No obstante, son conclusiones que aun no se pueden establecer, debido a que el grupo de estudio es pequeño y al tratar de reproducir la metodología, se enfrentaron complicaciones relacionadas con la concentración de proteína que se cargaba en cada pozo, por lo que esta pendiente la estandarización de la cantidad de proteína que se debe de cargar en cada carril para que ofrezca un patrón multimérico claro y fácil de analizar.

Sin embargo esta metodología es útil para el análisis de muestras de pacientes con concentraciones de FvW deficientes o normales, como es el caso de pacientes con enfermedad von Willebrand, (Helmunt 2010) pero para el análisis de muestras donde las concentraciones de FvW son superiores a las normales, es difícil interpretar los resultados debido a la variabilidad del patrón de bandeo, por lo que se deben estandarizar las condiciones que permitan un corrimiento en condiciones más homogéneas.

9. CONCLUSIONES

- El SCA está asociado con niveles plasmáticos elevados de FvW y con presencia de MAPM en la estructura multimérica de esta proteína.
- Los niveles mayores de FvW se observaron en los pacientes con diagnóstico de IAM en comparación con los pacientes que solo presentaron AI.
- La presencia de MAPM en la estructura del FvW en los pacientes con Cardiopatía isquémica, puede estar favoreciendo un estado de sangre vulnerable que predispone al desarrollo de complicaciones trombóticas en este tipo de pacientes.
- Este tipo de alteración también se presentó en pacientes con FA.
- Se requiere de la realización de más estudios que incluyan a una población más grande y que también incluyan otro tipo de padecimientos que dentro de su fisiopatología presenten el desarrollo de trombosis, para ver si la presencia de MAPM están presentes en otras patologías.
- Se requiere la realización de más investigación sobre el FvW para obtener más información, que permita al personal de la salud aplicar el conocimiento en beneficio de los pacientes.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abrams J. Clinical practice. Chronic stable angina. *N Engl J Med.* 2005;253:2278-2285
- Blann A. Von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. *Br J Biomed Sci* 1992;50:125-134
- Brass L. VWF meets the ADAMTS family. *Nat. Med.* 2001;7(11):1177-1178
- Branwald E. Application of current guidelines to the management of unstable angina and non-ST-elevation myocardial infarction. *Circulation.*2003;108(16 suppl 1)III28-37
- Budde U, Pieconka A, Will K, et al. Laboratory testing for Von Willebrand disease: Contribution of multimer analysis to diagnosis and classification. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32:514-521.
- Conway DS, Pearce LA, Chin BS, Hart RG, Lip GY. Prognostic value of plasma von Willebrand Factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with non-valvular atrial fibrillation. *Circulation* 2003;197:3142-5
- Diener JL, Lagasse HA, Duerschmied D. Inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet activation and thrombosis by the anti-von Willebrand factor A1-domain aptamer ARC1779. *J Thromb and Haemost* 2009;7:1155-1162
- Fressinaud E, Mazurier C, Meyer D. Molecular genetics of type 2 von Willebrand Disease. *Ind J. Hematol* 2002; 75:9-18
- Frossard M, Fuchs I, Leitner JM et al. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:1392-1397
- Hahn SA, Chandler C. Diagnosis and management of ST elevation myocardial infarction: a review of the recent literature and practice guidelines. *Mt Sinai J Med.*2006; 1:469-81

- Helmut W, Griesmacher A, Schnapka-Koepf, Goldere G, Sieberer A, Spanna M, Scheibe B, Perkhofer S, Will K, Budde U. Analysis of von Willebrand Factor Multimers by Simultaneous High- and Low-Resolution Vertical SDS-Agarose Gel Electrophoresis and Cy5-Labeled Antibody High-Sensitivity Fluorescence Detection. *Am J Clin Pathol* 2010;133:322-330
- Hoshiba Y, Hatakeyama K, Tanabe T, Asada Y, Goto S. Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelets with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2006;4:114-120
- <http://www.inegi.org.mx>
- Jansson JH, Nilsson TK, Johnson O. von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J* 1991;66:351-355
- Kao KIJ, Pizzo SV, Mckee PA. A radioreceptor assay for quantiting plasma factor VIII/von Willebrand's protein. *Blood*. 1981;57:579-585.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Laffan M, Mckinnon AJ. Blocking von Willebrand factor: a novel anti-platelet therapy. *J Thromb Haemost* 2009;9:1152-1154
- Mannuccio Mannucci P. von Willebrand Factor: A Marker of Endothelial Damage? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18:1359-1362
- Minchaux G, Abbitt KB, Collinson LM, Haberichter SL, Norman KE, Cutler DF. The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel Palade bodies. *Dev Cell* 2006; 10:4033-9
- Montalescot G, Collet JP, Choussant R et al. A rise of troponin and /or von Willebrand factor over the first 48 h is associated with a poorer 1-year outcome in unstable angina patients. *Int J Cardiol* 2000;72:293-294
- Montalescot G, Flammang D, Dutoit A, Carayon A, Jardel C, Chevrot M, Bastad JP, Bigonzi F, Thomas D. Early increase of von Willebrand factor

predicts adverse outcome in unstable coronary artery disease: beneficial effects of enoxaparin. French investigators of the ESSENCE Trial. *Circulation* 1998;98:294-299

- Paulinska P, Spiel A, Jilma B. Role of von Willebrand factor in vascular disease. *Hämostaseologie* 2009; 29: 32-38)
- Rodeghiero F. Von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine. *Haemophilia*. 2002;8:292-300.
- Rosenberg IM. (1996) "Protein Analysis and Purification Benchtop Techniques" 2nd ed., pp 55, Birkhäuser, Boston.
- Ruggeri ZM. Von Willebrand factor as a target for antithrombotic intervention. *Circulation* 1992;86:26-29
- Ruggeri ZM, Ware J. Von Willebrand factor. *Faseb J* 1993; 308-316
- Ruggeri ZM, Zimmermann TS. Variant von Willebrand's disease. Characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J Clin Invest* 1980;65:1318-1325
- Sadler JE. Von Willebrand Factor: two sides of a coin. *J Thromb Haem* 2005;3:1702-1709
- Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS 13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008;112:11-18
- Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK et al. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996; 88:2939-2950
- Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. Von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation* 2008; 117: 1449-1459
- Sura AC, Kelemen MD. Early management of ST-segment elevation myocardial infarction. *Cardiol Clin*. 2006;24:37-51
- Thompson SG, Kienast J, Pyke SD et al. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris.

European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angin Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995;332:635-641

- Varadi K, Rottensteiner S, Vejda A, et al. Species-dependent variability of ADAMTS-13- mediated proteolysis of human recombinand von Willebrand factor. *J Thromb Haem*, 7:1134-11542.
- Vischer UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1186–93.
- Wagner DD. Cel Biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:216-46
- Yang EH, Brilakis ES, Reeder GS, Gersh BJ, Management of acute myocardial infarction. *Curr Probl Cardiol.* 2006;12:769-817

ANEXOS

MATERIAL Y REACTIVO

- Tubos vacutainer citratados
- Kit para FvW:Ag (American Diagnostica)
- Solución de Acrilamida/Bis solución al 30% 29:1 (Biorad)
- Agarosa tipo V (Sigma Chemical Co.)
- Trizma base (Sigma Chemical Col.)
- Dodecil Sulfato de Sodio (Biorad)
- Temed (Biorad)
- Persulfato de Amonio (Biorad)
- EDTA (Sigma Chemical Col.)
- Urea (Sigma Chemical Col.)
- Glicina (Sigma Chemical Col.)
- Metanol (Merck)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Anticuerpo anti FvW (Rabbit Immunoglobulin to Human vWF, Dako)
- Conjugado de Burro anti IgG de conejo (Dako)
- Membranas PVDF (Immun-blot PVDF membrane for protein blotting 0.2 μ m Biorad)
- Luminol Western Blotting. Luminol Reagent. Santa Cruz Biotechnology
- Solución reveladora (Fujifilm X-Ray film developer rendor)
- Solución fijadora (Fujifilm X-Ray Film fixer renfix)
- X Ray Film 100 NIF 20x25 (8x10) Fuji Medical
- Papel filtro (Extra thick blot paper criterion size 8.5x13.5 cm)