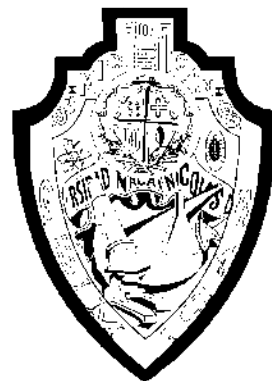




**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE
QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA**



TESIS

**“ESTUDIO MOLECULAR DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND EN PACIENTES
CON ARTRITIS REUMATOIDE”.**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Químico farmacobiologo

PRESENTA

LAURA GARCÍA QUEZADA

ASESOR DE TESIS

DOCTORA EN CIENCIAS MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

CO-ASESOR DE TESIS

MAESTRA EN CIENCIAS SANDRA EDITH LÓPEZ CASTAÑEDA

MORELIA, MICHOACÁN, JUNIO 2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la División de estudios de Posgrado de la facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en colaboración con el laboratorio clínico y la unidad de Reumatología del Hospital general Regional no. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social en la ciudad de Morelia Michoacán. Se contó con el financiamiento de la coordinación de investigación científica (SIC).

Dedicatorias.

“Con todo mi cariño y mi amor para la persona que hizo todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ti por siempre mi corazón y mi agradecimiento”

Mamá

“Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo”

Fam. Quezada Ibarra

“Por mostrarme que el éxito solo está bajo el esfuerzo y la constancia, por su apoyo y la oportunidad de trabajar junto a gente tan preparada y poder aprender de ustedes”

Integrantes del laboratorio de hemostasia y biología vascular

“Por tu amor, tu compañía y tu apoyo, porque somos las dos partes desiguales que completan una sola cosa, por todo lo que hemos caminado juntos y por lo que aún nos falta”

C.U.A.M.

“Los golpes de la vida, el paso de los años, han hecho lentas mis pisadas pero no mi decisión”. (Ardo por dentro, Warcry)

Agradecimientos.

A la D.C. Martha Eva Viveros:

Por haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto y la confianza para desarrollar mis habilidades a mi manera, por apoyar mis capacidades, corregir mis errores y ayudarme a mejorar.

A la M. en C. Sandra Edith López Castañeda:

Por enseñarme cada paso con paciencia, ayudarme en cada momento, acompañarme en este proceso y alentarme a lograr mis objetivos.

A mi familia:

Por ayudarme a superar cada aspecto de mi vida, enseñándome valores y aportándome la fuerza y confianza para utilizar las herramientas que tengo y así, continuar siempre hacia adelante.

A mis compañeros del laboratorio:

Por apoyarme complementando todo lo que aún me falta por aprender y ser un ejemplo de superación para mí, por su amistad y compañerismo, Nalle, Caro, Armando, Venice.

A mis revisores de tesis:

Por sus valiosas aportaciones y colaboración dentro de este proyecto.

Índice de contenidos:

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE RESULTADOS

ABREVIATURAS

GLOSARIO

1. Resumen.....	17
2. Abstract.....	18
3. Introducción.....	19
4. Marco Teórico.....	20
4.1 Factor de von Willebrand.....	20
4.1.1 Síntesis y estructura multimérica del Factor de von Willebrand.....	21
4.1.2 Factor de von Willebrand dentro de la hemostasia.....	25
4.1.3 Factor de von Willebrand fuera de la hemostasia.....	26
4.1.4 Factor de von Willebrand: las dos caras de una proteína.....	27
4.1.5 Factor de von Willebrand asociado a diversas patologías.....	29
4.1.6 Factor de von Willebrand y Artritis reumatoide.....	30
4.2 DAS 28.....	30
4.3 Artritis reumatoide.....	31
4.3.1 Definición.....	31
4.3.2 Fisiopatología.....	31
4.3.3 Riesgo cardiovascular y aterosclerosis en Artritis reumatoide.....	34
4.4 Riesgo cardiovascular en Artritis reumatoide y Factor von Willebrand....	37
4.5 Factor von Willebrand y anoikis.....	38
5. Justificación.....	42
6. Objetivo general.....	43
6.1 objetivos específicos.....	43
7. Material y métodos.....	44
7.1 Universo o población.....	44

7.2	Muestra.....	44
7.3	Diseño experimental.....	44
7.4	Criterios de inclusión.....	44
7.5	Criterios de exclusión.....	45
7.6	Criterios de eliminación.....	45
7.7	Toma de muestra.....	45
7.8	Metodología.....	46
7.8.1	Determinación de la concentración plasmática de Factor von Willebrand por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	46
7.8.2	Estudio de los multímeros del Factor von Willebrand por medio de Inmunoelctrotransferencia (Western blot) en dodecil sulfato de sodio (SDS) en geles de agarosa.....	47
7.8.2.1	Electroforesis en geles de agarosa 1.8%-1%.....	47
7.8.2.2	Preparación de la muestra.....	48
7.8.2.3	Corrimiento.....	49
7.8.2.4	Transferencia en semi-seco.....	49
7.8.2.5	Bloqueo de sitios inespecíficos.....	49
7.8.2.6	Inmunolocalización.....	49
7.8.2.7	Revelado.....	50
8.	Resultados.....	51
8.1	Características clínicas y demográficas.....	51
8.2	Estudio molecular del Factor de von Willebrand.....	54
8.3	Análisis densitométrico.....	58
9.	Discusión.....	64
10.	Conclusiones.....	67
11.	Bibliografía.....	68
12.	Anexos.....	72
12.1	Anexo I: material y reactivos.....	72
12.2	Anexo II: soluciones para electroforesis.....	73
12.3	Anexo III: soluciones para Western Blot.....	75

Índice de tablas		
Tabla 1	Diversidad funcional del FvW fuera de la hemostasia.	26
Tabla 2	Factores tradicionales de riesgo cardiovascular en Artritis reumatoide.	34
Tabla 3	Características clínicas y demográficas de los grupos de estudio Artritis reumatoide vs grupo control.	51
Tabla 4	Características clínicas y demográficas del grupo AR de acuerdo al tratamiento (convencional / biológico).	52
Tabla 5	Comparativo de patrones de bandeo de la estructura del FvW donde los multímeros de alto peso molecular son los más hemostáticamente efectivos entre pacientes con artritis reumatoide sin factores de riesgo cardiovascular y grupo sano.	57

Índice de figuras		
Figura 1	Peso molecular y actividad hemostática de los Multímeros del FvW derivados de plaquetas y células endoteliales.	20
Figura 2	Síntesis y multimerización del FvW.	21
Figura 3	Resumen de la síntesis y vías de liberación de los multímeros del FvW.	23
Figura 4	Reducción fisiológica de los multímeros del FvW por medio de la metaloproteinasa ADAMTS-13.	25
Figura 5	Dominios de la estructura del FvW y sitios de unión.	24
Figura 6	Secuencia RGD en la estructura de la glicoproteína IIb/IIIa, la cual le da la capacidad de unirse a otras proteínas que contengan esta misma secuencia en su estructura, tal como el FvW.	24
Figura 7	Adhesión y agregación plaquetaria mediada por el Factor von Willebrand.	25
Figura 8	Funcionalidad del ADAMTS-13 en la regulación del tamaño del FvW: a) Función en hemostasia normal. b) Deficiencia de ADAMTS-13 en PTT.	27
Figura 9	Elevación y disminución del Factor de von Willebrand en diversas patologías.	29
Figura 10	Fisiopatología de la Artritis reumatoide.	33
Figura 11	La inflamación como catalizador de enfermedad cardiovascular en Artritis reumatoide.	35
Figura 12	Disfunción endotelial y aterosclerosis: efectos de las lipoproteínas de baja densidad en el endotelio vascular	36
Figura 13	Liberación endotelial, agregación y adhesión plaquetaria mediada por FvW.	37
Figura 14	Estructura de una integrina, se muestra su secuencia RGD que reconoce receptores para fibrinógeno, fibronectina, FvW, entre otras proteínas.	38
Figura 15	La unión de las integrinas de las células endoteliales con la matriz extracelular activa varias rutas de supervivencia incluyendo ERK, JNK y Akt, que inhiben proteínas pro-apoptóticas.	39
Figura 16	La falta de contacto celular mediado por MEC, impide la acción de las señales de supervivencia, dejando que actúen las proteínas pro-apoptóticas y causando anoikis.	40

Índice de resultados		
Figura 17	Correlación positiva entre biomarcadores liberados en la fase aguda del proceso inflamatorio.	53
Figura 18	Comparación de la estructura multimérica del FvW en un control sano en el cual se observa un patrón de bandeo uniforme y en un paciente con artritis reumatoide cuya estructura presenta un predominio de multímeros de alto peso molecular (APM).	54
Figura 19	Comparación de densitogramas que muestran la presencia de multímeros de alto peso molecular (APM) en los patrones de bandeo de los pacientes con artritis reumatoide en comparación con un control.	55
Figura 20	Densitograma de la estructura molecular del FvW obtenido de un paciente con artritis reumatoide que muestra mayor densidad (intensidad) en los multímeros de alto peso molecular en comparación con los de bajo peso.	56
Figura 21	Densitograma de la estructura molecular del FvW obtenido de un control sano que muestra una mayor densidad (intensidad) en los multímeros de bajo peso molecular.	56
Figura 22	Imagen demostrativa de la presencia del multímeros de alto peso molecular en la estructura del FvW en un paciente con artritis reumatoide en comparación con un control.	57
Figura 23	Diferencia en la estructura molecular del FvW en un paciente con AR con tratamiento biológico y con tratamiento convencional, ambos con presencia de multímeros de alto peso molecular.	57
Figura 24	Grafica comparativa del análisis densitométrico de los patrones de bandeo del FvW, observamos una mayor densidad en la estructura multimérica de los pacientes con artritis reumatoide en comparación con el grupo control.	58
Figura 25	Grafico comparativo de la concentración plasmática del FvW, observamos niveles ligeramente más elevados del FvW en los pacientes con artritis reumatoide en comparación con el grupo control.	59
Figura 26	Gráfico de dispersión que muestra una correlación positiva entre la concentración del FvW y la citocina proinflamatoria TNF α .	60
Figura 27	Grafico comparativo de la concentración y la densidad de la estructura molecular del FvW de acuerdo a la actividad de la enfermedad.	61
Figura 28	Grafica comparativa de la concentración del FvW de acuerdo al tratamiento bajo el que se encontraban los pacientes con artritis reumatoide, observamos una concentración más alta del FvW en los pacientes que se encontraban con terapia Anti-TNF α en comparación con los que se encontraban con fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad.	62
Figura 29	Gráfico de dispersión que muestra una correlación positiva de la concentración del FvW con el factor reumatoide.	63

Abreviaturas:

- **A.A:** Aminoácido.
- **ADAMTS 13:** A Disintegrin and Metalloprotease with Trombospondin Type 1 motifs.
- **AF:** Adhesión focal.
- **AINES:** Antiinflamatorios no esteroideos.
- **Akt:** Proteína kinasa B.
- **APC:** Células presentadoras de antígeno.
- **APM:** Alto peso molecular.
- **AR:** Artritis reumatoide.
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- **BPM:** Bajo peso molecular.
- **CD:** Célula dendrítica.
- **CE:** Célula endotelial.
- **CI:** Cardiopatía isquémica.
- **CID:** Coagulación intravascular diseminada.
- **DAS 28:** Disease Activity Score en 28 articulaciones.
- **DDAVP:** Desamino-D- arginina- vasopresina.
- **ECV:** Enfermedad cardiovascular.
- **ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay.
- **ERK:** Extracellular signal-regulated kinase.
- **EVA-100:** Escala visual análoga.
- **EvW:** Enfermedad de von Willebrand.
- **FA:** Fibrilación auricular.
- **FAK:** Focal adhesion kinase.
- **FARMES:** Fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad.
- **FVIII:** Factor 8 de la coagulación.
- **FvW:** Factor von Willebrand.
- **IL1:** Interleucina 1.
- **ILK:** Kinasa ligada a integrina.
- **IMC:** Índice de masa corporal.
- **JNK:** Jun N-terminal kinase.
- **KDA:** Kilodaltones.
- **LES:** Lupus eritematoso sistémico.
- **MAPM:** Multímeros de alto peso molecular.
- **MEC:** Matriz extracelular.
- **MTX:** Metotrexato.

- **Nm:** Nanómetro.
- **OMM:** Membrana mitocondrial externa.
- **P13K:** Fosfatidilinositol 3 kinasa.
- **PAI-1:** Inhibidor del activador del plasminógeno 1.
- **PMI:** Peso molecular intermedio.
- **PS:** Fosfatidilserina.
- **PTT:** Púrpura trombocitopénica trombótica.
- **PVDF:** Polifluoruro de Vinilideno.
- **RE:** Retículo endoplásmico.
- **RGD:** Secuencia Arg-Gly-Asp.
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno.
- **RPM:** Revoluciones por minuto.
- **SDM:** Solución de dilución de la muestra.
- **SDS:** Dodecil sulfato de sodio.
- **Shc:** Adaptor protein.
- **SP:** Péptido de señal.
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral α .
- **T-PA:** Activador tisular del plasminógeno.
- **TRIS:** Tris (hidroximetil) aminometano.
- **UI/dL:** Unidades internacionales/decilitro.
- **VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular.
- **VPM:** Volumen plaquetario medio.
- **VSG:** Velocidad de sedimentación globular.
- **WPB:** Corpúsculos de Weibel-Palade.

Glosario:

- **Accidente cerebrovascular:** enfermedad vascular que ocurre cuando se bloquea el flujo de sangre en las arterias que nutren el cerebro, o cuando ocurre un sangrado en el cerebro mismo o en las membranas que lo rodean.
- **Activador tisular del plasminógeno:** proteína proteolítica implicada en la lisis de coágulos de sangre que se encuentra en células endoteliales y es segregado por el endotelio vascular después de sufrir una lesión, su función es activar el plasminógeno transformándolo en plasmina.
- **Adhesión plaquetaria:** interacción plaqueta-endotelio vascular.
- **Adrenalina:** hormona secretada por el sistema nervioso central donde actúa como neurotransmisor, provocando una serie de respuestas fisiológicas inmediatas: aceleración del ritmo cardíaco, incremento de la presión arterial y la dilatación de los bronquios.
- **Agarosa:** polisacárido soluble en agua que forma una matriz inerte y no tóxica que supone una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de biología molecular.
- **Agregación plaquetaria:** interacción plaqueta-plaqueta.
- **Angiogénesis:** proceso fisiológico de formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos preexistentes; es normal en el proceso embrionario, crecimiento, cicatrización, etc., pero es patológico en la formación de tumores malignos.
- **Apoptosis:** muerte celular programada por el mismo organismo, con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento desencadenada por señales celulares controladas.
- **Ateroesclerosis:** enfermedad de las arterias en la cual, el material graso se deposita en la pared de estos vasos sanguíneos ocasionando un deterioro progresivo y reducción del flujo sanguíneo.
- **Bradicinina:** polipéptido formado en plaquetas, cuyos efectos son la contracción de los músculos lisos, aumento de la permeabilidad capilar, dilatación arterial, etc.
- **Cardiopatía isquémica:** enfermedad ocasionada por la arteriosclerosis de las arterias coronarias, encargadas de proporcionar sangre al músculo cardíaco (miocardio).
- **Células dendríticas:** tipo especial de célula inmunitaria que se encuentra en los tejidos, como la piel, y estimula las respuestas inmunitarias al presentar en su superficie un antígeno ante las otras células del sistema inmunitario. Una célula dendrítica es un tipo de fagocito y un tipo de célula presentadora de antígeno.

- **Célula endotelial:** células aplanadas que recubren el interior de los vasos sanguíneos y que tienen la capacidad de adaptar su estado funcional a diversos estímulos.
- **Citocromo c:** citocromo que contiene el grupo hemo c, los citocromos son proteínas que desempeñan una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas.
- **Citoquinas:** conjunto de proteínas que regulan interacciones de las células del sistema inmune, cuya función inmunorreguladora es clave en la respuesta inmune, en la inflamación y en la hematopoyesis de distintos tipos celulares.
- **Citosol:** solución saturada de diferentes tipos de moléculas que ocupa la mayor parte del volumen celular.
- **Coagulación intravascular diseminada:** proceso patológico producido como resultado de la activación y estimulación excesiva del sistema hemostático, la cual supera la capacidad de control del organismo.
- **Colágeno:** proteína esencial en la formación del tejido conectivo, se presenta en forma de fibras que permiten resistencia a la elasticidad de los tejidos.
- **Corpúsculos Weibel-Palade:** gránulos de almacenamiento que poseen las células del endotelio que revisten el interior de los vasos sanguíneos y del corazón, almacenan y liberan principalmente dos moléculas, el factor de von Willebrand y la P-selectina.
- **Desmopresina:** fármaco sintético de acción antidiurética.
- **Edema:** acumulación de líquido en el espacio tejido intercelular o intersticial, además de las cavidades del organismo.
- **Electroforesis:** técnica utilizada para la separación de moléculas de acuerdo a la movilidad de estas en un campo eléctrico.
- **Enfermedad cardiovascular:** conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos.
- **Especies reactivas de oxígeno:** conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno.
- **ERK:** cascada que se activa mediante una variedad de agentes extracelulares, tales como factores de crecimiento y hormonas, que conducen a la inducción de la proliferación y diferenciación celular.
- **Estatinas:** fármacos hipolipemiantes (reducen los niveles de lípidos en sangre) cuya acción consiste en inhibir la síntesis de colesterol, utilizados en la prevención de enfermedades cardiovasculares.
- **Factor de necrosis tumoral α :** citocina que interviene en la inflamación, apoptosis y destrucción articular secundaria producida por macrófagos en respuesta a daño tisular o infección
- **FAK:** proteínas intracelulares involucradas en la regulación del anclaje celular mediado por integrinas.

- **FAS ligando:** proteína transmembrana de tipo II perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral, su unión con su receptor induce apoptosis.
- **Fibrilación auricular:** enfermedad caracterizada por latidos auriculares incoordinados y desorganizados, produciendo un ritmo cardíaco rápido e irregular.
- **Fibrina:** proteína filamentosa derivada del fibrinógeno que contribuye en la formación del coágulo sanguíneo.
- **Fibronectina:** glicoproteína adhesiva presente en forma soluble en plasma e insoluble en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos.
- **Fosfatidilserina:** componente de los fosfolípidos que se encuentra en la monocapa lipídica interior.
- **Fosforilación:** adición de un grupo fosfato inorgánico a cualquier otra molécula.
- **Glicoproteína:** molécula compuesta por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos, tiene funciones estructurales y de reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas.
- **Glucosilación:** proceso bioquímico en el que se adiciona un glúcido a otra molécula que puede ser de naturaleza proteica, lipídica, etc.
- **Gránulos plaquetarios α :** organelos esféricos cuyas membranas contienen GPIIb/IIIa, pequeñas cantidades de GPIb, GPIX, P selectina y propician la interacción entre plaquetas y otras células a través de la liberación de su contenido.
- **Hemostasia:** mecanismo de defensa del organismo que se activa tras haber sufrido un traumatismo o lesión que previene la pérdida de sangre del interior de los vasos sanguíneos.
- **Hiperplasia:** incremento en la producción de células en un órgano o tejido.
- **Hipertrofia:** crecimiento excesivo y anormal de un órgano o de una parte de él debido a un aumento del tamaño de sus células.
- **ILK:** quinasa que forma parte de las adhesiones focales y se encuentra involucrada en la transducción de señales y la adhesión de las células a la matriz extracelular, regulando procesos de crecimiento, proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, invasión y angiogénesis celular.
- **Inflamación:** conjunto de reacciones generadas por el organismo en respuesta a una agresión que puede ser de origen externo como una lesión, infección o traumatismo o puede ser de origen interno, como es el caso de las enfermedades autoinmunes.
- **Integrinas:** glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular y median las interacciones célula- célula o célula-matriz extracelular, cuentan con diversas funciones en varios procesos biológicos como agregación

plaquetaria, inflamación, función inmune, reparación de tejidos, metástasis celular e intervienen en patologías como cáncer, trombosis y enfermedades inflamatorias.

- **Interleucina 1:** citocina producida por los fagocitos mononucleares activados cuya función principal consiste en participar en la respuesta inflamatoria correspondiente a la inmunidad innata del huésped, entre sus efectos biológicos se encuentran la inducción de moléculas de adhesión en las células endoteliales, la estimulación de la producción de quimiocinas por las células endoteliales y macrófagos, estimulación de la síntesis de reactantes de fase aguda por el hígado y la fiebre.
- **Interleucina 6:** citocina producida por fagocitos mononucleares activados, células endoteliales y fibroblastos que actúa tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y el crecimiento de los linfocitos B.
- **JNK:** quinasas activadas por mitógenos que responden a estímulos pro-inflamatorios y condiciones de estrés celular, su actividad se encuentra exacerbada en patologías en cuyo origen o progresión interviene un componente inflamatorio como el cáncer, la aterosclerosis, la artritis, el asma, la obesidad, diabetes, etc.
- **Linfotoxina:** miembro del grupo de factores de necrosis tumoral liberado por los linfocitos activados por antígenos o mitógenos de células T.
- **Macrófago:** células mononucleadas caracterizadas por su capacidad de fagocitar y degradar material particulado también tienen la capacidad de secretar diversos factores y participan en la respuesta inmune como células presentadoras de antígeno.
- **Mastocitos:** células del tejido conjuntivo que actúan como mediadores de procesos inflamatorios y alérgicos, sintetizan y almacenan histamina, entre otros elementos.
- **Matriz extracelular:** conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido.
- **Miocarditis:** inflamación del miocardio.
- **P13k/Akt:** vía de señalización involucrada en numerosos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular, que conduce a la activación de la proteína Akt, la fosforilación mediante esta proteína genera sitios de ligando para proteínas importantes en la regulación de la localización celular (Pinzón, Serrano, & Sanabria, 2009).
- **Pericarditis:** afección en la cual la cubierta similar a un saco alrededor del corazón (pericardio) resulta inflamada.

- **Plaquetas:** células sanguíneas que cumplen una importante serie de funciones relacionadas con el proceso de coagulación y la reparación de los tejidos tras un daño.
- **Plasmina:** proteasa de amplio espectro que destruye a la fibrina durante el mecanismo de la fibrinólisis.
- **P-selectina:** proteína que participa en la adhesión plaqueta-endotelio se almacena en gránulos plaquetarios y células endoteliales.
- **Púrpura trombocitopénica trombótica:** enfermedad caracterizada por un proceso de agregación intravascular, su fisiopatología se basa en la deficiencia de la metaloproteasa ADAMTS13.
- **Shc:** proteína adaptadora, transductora y moduladora de RTKs (receptores con actividad tirosina-quinasa).
- **Trombina:** enzima sanguínea que cataliza la transformación del fibrinógeno en fibrina durante el proceso de coagulación.
- **Valvulitis:** proceso inflamatorio de una válvula, especialmente de una válvula cardíaca, las alteraciones inflamatorias de las válvulas aórtica, mitral y tricúspide del corazón se deben con mayor frecuencia a fiebre reumática.
- **Vasculitis:** inflamación de los vasos sanguíneos, lo cual, determina deterioro u obstrucción al flujo de sangre y daño a la integridad de la pared vascular.
- **Vasopresina:** hormona peptídica que aumenta la reabsorción tubular de agua en los túbulos distales y colectores de los riñones y posibilita así la concentración de la orina; asimismo, produce vasoconstricción periférica generalizada y contracción de la musculatura lisa digestiva y vesical, y modula el sistema nervioso central.
- **Velocidad de sedimentación globular:** método indirecto de la valoración de las distintas proteínas de la fase aguda (fibrinógeno, inmunoglobulinas, albúmina), cuya elevación puede implicar procesos inflamatorios, infecciosos o neoplásicos.

1. Resumen.

Introducción: el Factor de von Willebrand (FvW) es una proteína sintetizada y almacenada específicamente en plaquetas y células endoteliales que circula en forma de multímeros, siendo más efectivos hemostáticamente los de alto peso molecular (APM). Esta proteína ha sido señalada como biomarcador de daño endotelial y participa biológicamente dentro de la hemostasia, sin embargo, debido a su capacidad para promover la adhesión y agregación plaquetaria también podría ser un componente crítico en estados patológicos de hipercoagulabilidad, formación de trombos vasculares y enfermedad cardiovascular, los eventos de inflamación aguda o crónica son predisponentes para el desarrollo de disfunción endotelial, estado que ha sido relacionado con el incremento de la comorbilidad cardiovascular (35-50%) en pacientes con artritis reumatoide.

Objetivos: estudiar en pacientes y controles la concentración plasmática y estructura multimérica del FvW y correlacionar con parámetros clínicos, biomarcadores de inflamación y actividad clínica de la enfermedad reumatológica determinada por DAS28.

Métodos: estudio de cohorte, casos y controles, comparativo, prolectivo, transversal. Fueron incluidos pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide (n=30) exentos de factores de riesgo cardiovascular tradicionales, en un estado activo de la enfermedad y controles sanos (n=20). Se realizó la determinación plasmática del FvW por ELISA y análisis de la estructura multimérica con énfasis en multímeros de elevado peso molecular del FvW mediante Inmunoelctrotransferencia (Western blot) en dodecil sulfato de sodio (SDS) en geles de agarosa.

Resultados: en comparación con el grupo control la densidad en la estructura del FvW de los pacientes con AR se encontró significativamente más elevada [(86.8±36.5) vs (65.2±15.5) P=0.013], en comparación con la concentración plasmática del FvW [AR (126.1±33.6) vs C (110.6±21.2) P=0.077]. Se observó una mayor presencia de multímeros de alto peso molecular (MAPM) en los pacientes con AR y una asociación significativa del biomarcador inflamatorio TNF α con la concentración plasmática del FvW.

Conclusiones: a pesar de los significativos avances que ha habido en el tratamiento de los trastornos reumatológicos la enfermedad cardiovascular (ECV) sigue siendo significativamente mayor en estos pacientes, a pesar de estar exentos de factores de riesgo cardiovascular tradicionales, el FvW se comportó de manera independiente concentración/funcionalidad en estos pacientes presentando concentraciones plasmáticas normales y una estructura molecular alterada con presencia de multímeros de alto peso molecular lo que coloca estos pacientes en un estado de disfuncionalidad endotelial y riesgo protrombótico. **Palabras clave:** Factor de von Willebrand, MAPM, artritis reumatoide, inflamación, disfunción endotelial.

2. Abstract

Introduction: the von Willebrand Factor (vWF) is a specifically synthesized and stored in platelets and endothelial cells protein circulates as multimers being more effective hemostatically the high molecular weight (HMW). This protein has been identified as a biomarker of endothelial damage and is involved biologically in hemostasis, however, because of its ability to promote platelet adhesion and aggregation could also be a critical component in pathological hypercoagulable states, formation of vascular thrombus and disease cardiovascular events in acute or chronic inflammation are predisposing to the development of endothelial dysfunction, a state that has been linked to increased cardiovascular morbidity (35-50%) in patients with rheumatoid arthritis.

Objectives: study in patients and controls the plasmatic concentration and vWF multimeric structure and correlate with clinical parameters, inflammation biomarkers and clinical activity determined by DAS28 rheumatologic disease.

Methods: study of cohort, cases and controls, comparative, prolective, transversal. Were included patients with rheumatoid arthritis diagnostic (n=30) without traditional factors of cardiovascular risk, in an active state disease and healthy controls (n=20). Plasma vWF determination by ELISA and analysis of multimeric structure with emphasis on high molecular weight multimers of vWF by immunoblotting (Western Blot) was performed in sodium dodecyl sulfate (SDS) in agarose gels.

Results: compared with control group the density in the structure of vWF from patients with rheumatoid arthritis were found significantly higher [(86.8±36.5) vs (65.2±15.5) P=0.013], compared to the plasma concentration of vWF [AR (126.1±33.6) vs C (110.6±21.2) P=0.077]. A greater presence of high molecular weight multimers (HMW) in patients with RA and a significant association with TNFα inflammatory biomarker and plasma concentration of vWF was observed.

Conclusions: despite the significant progress that has occurred in the treatment of rheumatic disorders, cardiovascular disease (CVD) remains significantly higher in these patients, despite being exempt from traditional cardiovascular risk factors, vWF behaved independently concentration/functionality in these patients presenting normal plasma concentrations and altered molecular structure with the presence of high molecular weight multimers which places these patients in a state of endothelial dysfunction and prothrombotic risk.

Key words: von Willebrand Factor, HMWM, rheumatoid arthritis, inflammation, endothelial dysfunction.

Estudio Molecular del Factor de Von Willebrand en pacientes con Artritis Reumatoide.

3. Introducción.

El factor de von Willebrand es una glicoproteína de importancia hemostática, cuya estructura multimérica le confiere la capacidad de interactuar con diversos tipos de moléculas, ya que en cada monómero posee dominios que le permiten participar en la adhesión y agregación plaquetaria, interaccionar con el subendotelio y regular indirectamente la coagulación pues es el transportador y protector del Factor VIII de la coagulación. Es una proteína multifuncional cuyos cambios en estructura, función o concentración llevan a la alteración del delicado equilibrio hemostático.

Con el paso del tiempo se han ido detallando las características de esta singular proteína, cuyos análisis en cuanto a concentración como a estructura molecular han sido de gran trascendencia dentro de la enfermedad de von Willebrand; sin embargo en otras enfermedades en las cuales se ha encontrado elevada la concentración plasmática de este factor, tal como enfermedades trombofílicas, autoinmunes y afecciones cardiovasculares, no se cuenta con estudios acerca de su estructura molecular.

4. MARCO TEORICO.

4.1 Factor von Willebrand.

El factor Von Willebrand (FvW) es una glicoproteína plasmática multimérica mejor conocida a partir de su papel crítico en la hemostasia, sintetizada y almacenada de forma específica en plaquetas y células endoteliales, circula en el plasma en multímeros desde 800 a 20,000 KDa, siendo la proteína soluble más grande en plasma sanguíneo (Lenting, Casari, Christophe, 2012)(Martínez & Quintana, 2008)(Espitia, 2010)(Ledford-kraemer, 2010).

El FvW es codificado por un gen del brazo corto del cromosoma humano 12. El gen abarca 178 kb de ADN y comprende 52 exones que codifican un ARNm de 9 kb, lo que dificulta su análisis genético molecular (Lillicrap, 2008)(Lillicrap & James, 2009).

Hay tres tipos de FvW en el cuerpo humano: FvW plasmático, FvW de la membrana basal (FvW de la matriz extracelular) y FvW celular (Ping, Ni, & Yang, 2012).

El FvW existe en varios tamaños de acuerdo a su peso molecular:

- Multímeros de bajo peso (500-2 500 kDa).
- Multímeros de peso intermedio (3 000-5 000 kDa).
- Multímeros de alto (5 500-10 000 kDa) y ultra-alto peso (>10 000 kDa).

Los multímeros de peso alto y ultra-alto son almacenados en plaquetas y células endoteliales y al ser liberados se ven sometidos a una reducción fisiológica, estableciendo así, un control del tamaño de los multímeros circulantes en el plasma sanguíneo, esto debido a que la actividad hemostática de los multímeros depende de su dimensión, cuando el tamaño del multímero decrece progresivamente hay una concomitante pérdida de su funcionalidad (**Figura 1**) (Stockschlaeder, Schneppenheim, & Budde, 2014).

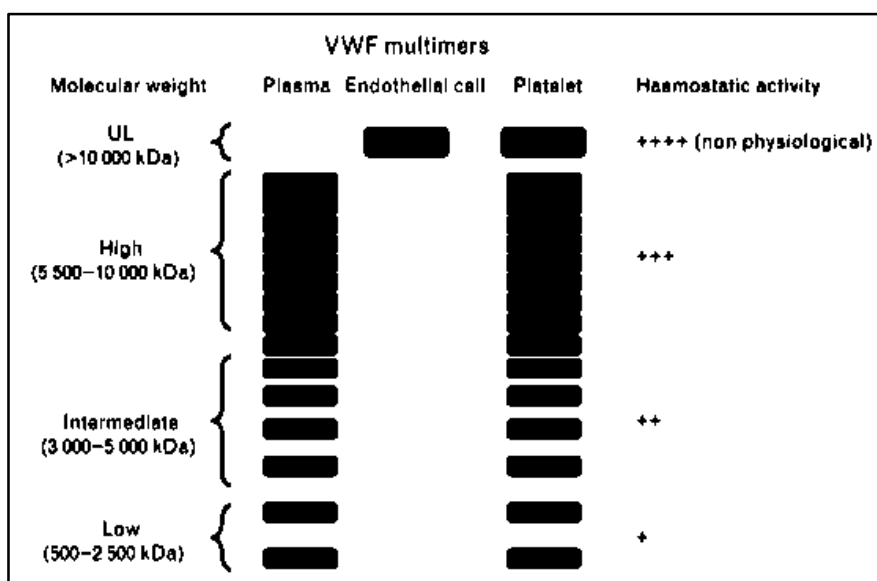


Figura 1: Peso molecular y actividad hemostática de los Multímeros del FvW derivados de plaquetas y células endoteliales.

El nivel medio en plasma de FvW en sujetos sanos es de 100 UI / dL, siendo amplia la variabilidad de la población, se considera como rango normal la detección de entre 50 y 200 UI/dL de FvW en plasma mediante técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)(Sadler, 2005).

En un estudio realizado en población mexicana en sujetos sanos se obtuvo como resultado la concentración de 55-136 UI / dL con una media de 95 UI / dL, edad de 60 años y 70 % hombres (Muñoz et al., 2015). Cabe resaltar que algunos estudios sugieren que en mujeres, los niveles plasmáticos del FvW suelen ser mayores, lo cual se ha atribuido a un efecto hormonal (Martínez, Berges, García, Hernández, Murillo, 2010).

4.1.1 Síntesis y estructura multimérica del Factor de von Willebrand.

El ARNm codifica para una proteína de alrededor de 2,813 aminoácidos (aa) llamada pre-pro-FvW, este producto inicial de 300 a 350 kDa pierde una fracción llamada "péptido de señal" (SP) que consta de 22 aa, que inicia el proceso de formación de la proteína del FvW, después de esta pérdida el pro-polipéptido de 2791 aa, forma dímeros a través de la formación de puentes disulfuro en las porciones carboxi-terminales, posteriormente se lleva a cabo la glucosilación en el aparato de Golgi lo que resulta en un alto contenido de carbohidratos. La proteína madura de 2051 aa, forma puentes de disulfuro en las porciones amino-terminales de los dímeros, se forman series de multímeros de diferente tamaño que van desde una sola unidad fundamental de 225 kDa hasta 120,000 kDa (Martínez & Quintana, 2008). Estos multímeros son todos funcionales, a pesar de las diferencias en su tamaño, siendo más efectivos hemostáticamente los de elevado peso molecular (Figura 2).

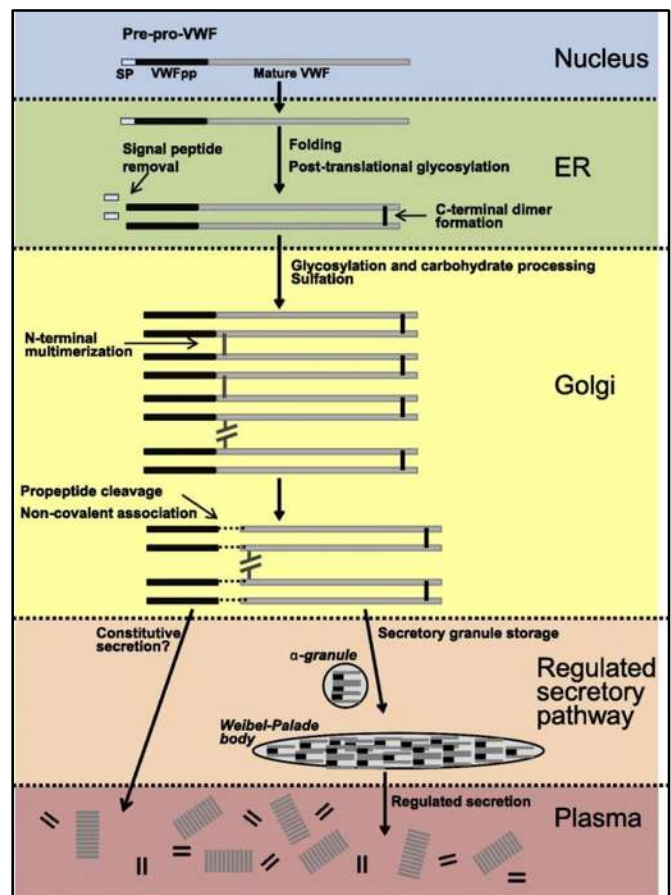


Figura 2: Síntesis y multimerización del FvW (Haberichter, 2015).

Una vez que se ha realizado la síntesis, el FvW es secretado a través de una de dos vías distintas:

- Secreción constitutiva: liberación de multímeros pequeños, directo del aparato de Golgi.
- Secreción regulada: liberación de multímeros de FvW de los sitios de almacenamiento intracelular (gránulos alfa de las plaquetas y cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales) (Lillicrap, 2008) (**Figura 3**).



Figura 3: Resumen de la síntesis y vías de liberación de los multímeros del FvW.

El FvW puede ser liberado de plaquetas y células endoteliales en respuesta a una gran variedad de estímulos fisiológicos y farmacológicos (Lillicrap & James, 2009). Los productos que inducen esta liberación del FvW a la circulación son: trombina, calcio, fibrina, activador tisular del plasminógeno (t-PA), plasmina, adrenalina, epinefrina, bradicinina, interleucina 1, la fuerza de cizallamiento (shear stress), vasopresina y su análogo sintético la desamino-D-arginina-vasopresina (DDAVP) o desmopresina, también el ejercicio físico moderado o extremo (Hernández et al., 2014)(Martínez & Quintana, 2008). Este factor también se ve afectado de acuerdo a la raza, edad, grupo sanguíneo ABO (FvW disminuido en el grupo O), mediadores inflamatorios y hormonas endocrinas (particularmente las asociadas al embarazo, donde el FvW se incrementa de 3 a 5 veces) (Martínez, Berges, García, Hernández, Murillo, 2010).

Luego de su liberación de la célula de síntesis, multímeros extremadamente grandes de FvW se unen a la superficie de la célula endotelial, por lo menos parcialmente, mediante una interacción con la proteína de la membrana Weibel-Palade, la P-selectina. En este sitio, los multímeros del FvW se ven sometidos a la fuerza de cizallamiento del flujo sanguíneo y tiene lugar una reducción fisiológica del tamaño de los multímeros mediante un evento de fragmentación proteolítica controlado, el cual, es un mecanismo de autorregulación del tamaño de los multímeros para impedir que la proteína sea demasiado adhesiva. El sitio de fragmentación en el FvW es en el dominio A2, entre los AA 1605 y 1606, y la fragmentación es mediada por la metaloproteínasa, ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with TromboSpondin Type 1 motifs) (Figura 4) (V. García, 2004)(Lillicrap, 2008)(Ledford-kraemer, 2010).

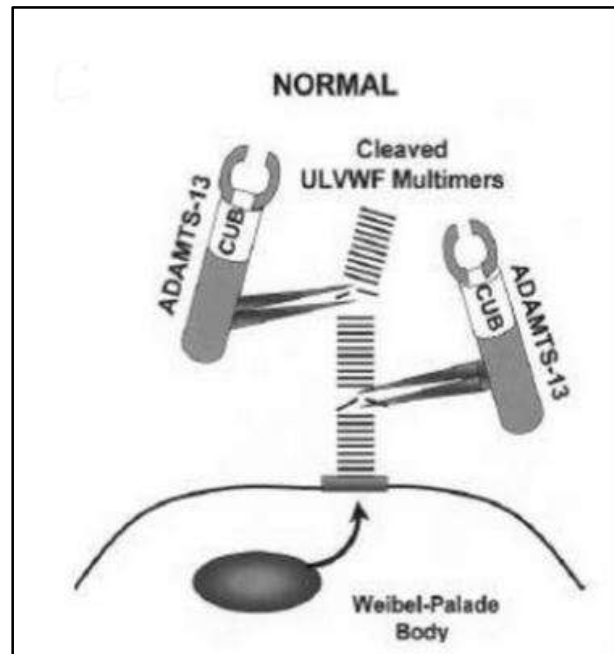


Figura 4: Reducción fisiológica de los multímeros del FvW por medio de la metaloproteínasa ADAMTS-13.

Cada subunidad funcional del FvW, comprende 2,050 residuos de aminoácidos y contiene sitios de unión al colágeno, FVIII, plaquetas y para las glicoproteínas plaquetarias (Ib/IX, IIb/IIIa) (Lillicrap & James, 2009)(Martínez & Quintana, 2008)(Martínez, Berges, García, Hernández, Murillo, 2010).

La estructura primaria de la proteína del FvW está formada por varios dominios repetidos designados desde la A hasta la D. Los dominios D1, D2, D' y D3 participan en la regulación del proceso de formación de multímeros, y las regiones D' y D3 también median la unión con el FVIII. Tanto el dominio A1 como el A3 poseen propiedades de unión al colágeno. Los sitios donde el FvW se une a las plaquetas son: en el dominio A1 al receptor plaquetario de glicoproteína Ib/IX (GpIb/IX) y en el dominio C1 al receptor de glicoproteína IIb/IIIa (GpIIb/IIIa). El dominio C1 contiene la secuencia RGD reconocida por las integrinas beta tres (Ruggeri, 2007) (Figura 5).

Por ende, cada monómero de FvW posee dominios que permiten a la proteína unirse a ligandos de las plaquetas (GpIb/IX y GpIIb/IIIa), en el subendotelio (colágeno) y en el torrente sanguíneo (FVIII) (Lillicrap, 2008).

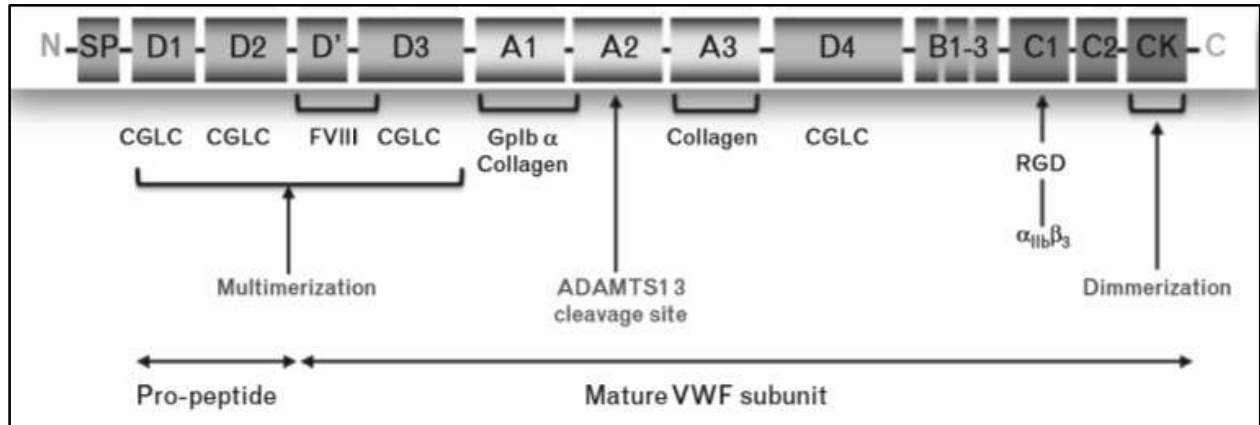


Figura 5: Dominios de la estructura del FvW y sitios de unión (Stockschlaeder et al., 2014).

En sitios de alta fricción (high shear stress) se induce la exposición del dominio A1 y pérdida del efecto de los dominios A2 y D, D3 (Martínez, Berges, García, Hernández, Murillo, 2010). En estos sitios se ha demostrado la activación del sitio de unión de la GpIIb/IIIa sobre la membrana plaquetaria, esta activación es capaz de unir plaquetas por medio del FvW y otras proteínas que contengan en su estructura la secuencia tetrapeptídica Arg-Gly-Asp (secuencia RGD) implicada en la adhesión celular (Figura 6) (Martínez & Quintana, 2008)(Batlle, 1993).

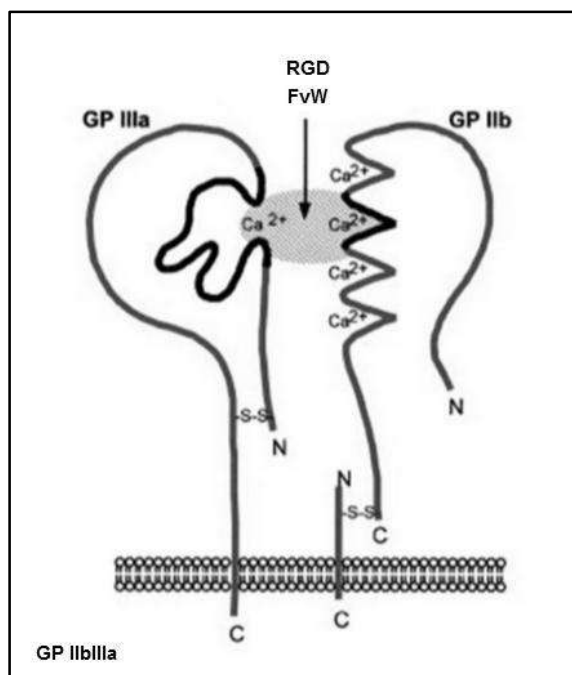


Figura 6: Secuencia RGD en la estructura de la glicoproteína IIb/IIIa, la cual le da la capacidad de unirse a otras proteínas que contengan esta misma secuencia en su estructura, tal como el FvW.

El FvW circula en una forma globular bajo condiciones de esfuerzo de corte bajo, pero se transforma en una forma alargada bajo la influencia del aumento de fuerzas de cizallamiento (shear stress), esto es, las fuerzas de roce, turbulencia y flujo que ocurren principalmente en los vasos sanguíneos de alto calibre y en las bifurcaciones arteriales (Lenting, Casari, Christophe, 2012).

4.1.2 Factor de von Willebrand dentro de la hemostasia.

La estructura del FvW posee distintos dominios que intervienen en la unión a glicoproteínas específicas, permitiéndole así efectuar tres funciones importantes dentro de la hemostasia (Espitia, 2010):

1. Facilita la adhesión plaquetaria (interacción plaqueta-endotelio) a la pared del vaso sanguíneo lesionado mediante la unión a Gplb-IX y formando puentes de unión con la colágena (Martinez & Quintana, 2008)(Lillicrap & James, 2009).
2. Participa en la agregación plaquetaria (interacción plaqueta-plaqueta) mediante la unión a Gplb-IIIa (Martinez & Quintana, 2008)(Lillicrap & James, 2009) (**Figura 7**).
3. Unión al FVIII evitando la degradación proteolítica del mismo (Martinez & Quintana, 2008).

Se forma el complejo FVIII/FvW, la trombina activa al factor FVIII y lo libera del FvW para su función en la hemostasia secundaria (complejo X-asa) y el FvW para su función de adhesión y agregación plaquetaria (Martinez & Quintana, 2008).

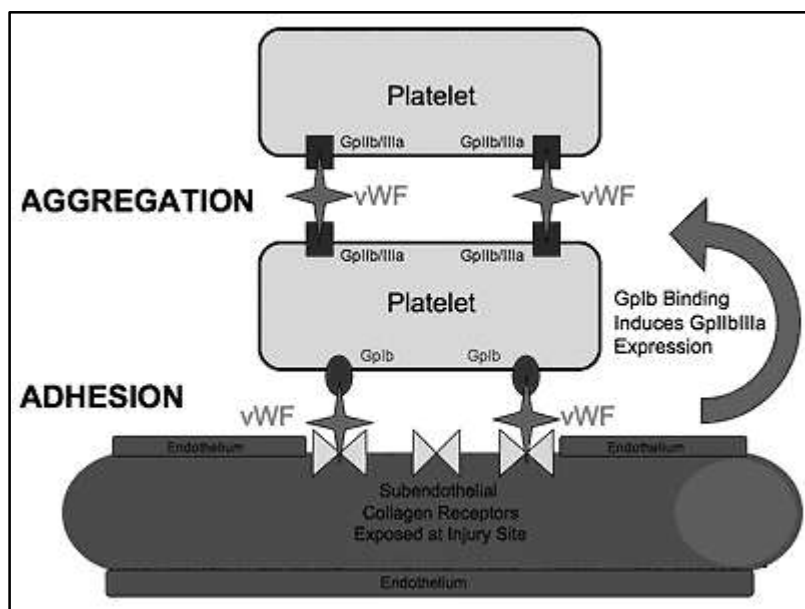


Figura 7: Adhesión y agregación plaquetaria mediada por el Factor von Willebrand.

4.1.3 Factor von Willebrand fuera de la hemostasia.

El FvW es una buena muestra de versatilidad funcional (V. García, 2004), ya que lleva acabo funciones dentro y fuera de la hemostasia (Tabla 1) y su arquitectura le ofrece el potencial de interactuar con un amplio espectro de estructuras, y, de hecho, un gran número de proteínas y no proteínas se han identificado como ligandos para FvW (Lenting, Casari, Christophe, 2012).

Funciones del FvW fuera de la hemostasia	
	FvW contribuye a complicaciones aterotrombóticas.
	FvW contribuye a tromboembolismo venoso.
	FvW muestra actividad proinflamatoria en accidente cerebrovascular, aterosclerosis y otras condiciones de inflamación
	FvW es un modulador negativo de angiogénesis.
	FvW es crítico para el reclutamiento de plaquetas bajo elevadas fuerzas de cizallamiento.
	FvW actúa como un transporte molecular para FVIII y otras proteínas en la circulación, protegiéndolos de proteólisis.
	FvW muestra actividad mitogénica hacia las células musculares lisas
	FvW induce apoptosis en plaquetas y células tumorales.

Tabla 1: Diversidad funcional del FvW fuera de la hemostasia (Lenting, Casari, Christophe, 2012).

La larga lista de ligandos para el FvW contiene una serie de proteínas que están involucrados en varios procesos, entre ellos los procesos de señalización celular. El arquetipo de la señalización mediada por FvW se refiere a su interacción con su receptor plaquetario GPIBA, que inicia la señalización transmembrana de eventos que al final resultan en la activación y la agregación plaquetaria por GP IIb/IIIa (aIIbb3) (Lenting, Casari, Christophe, 2012). En el desarrollo de tumores el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) estimula la proliferación endotelial, determinando mayores niveles plasmáticos de FvW (Gil, Páramo, & García, 2003).

Hay indicios de que el FvW puede participar activamente en la respuesta inflamatoria, funcionando como una superficie adhesiva para leucocitos a través de interacciones con el ligando - 1 GP P- selectina y B2 integrinas.

También se le han atribuido al FvW posibles propiedades pro-apoptóticas a plaquetas, posiblemente inducida a través del eje FvW - GPIBA, en una vía que implica la caspasa- 3, Bak, y Bax (Lenting, Casari, Christophe, 2012).

Estudios recientes también han indicado que el FvW puede funcionar como un promotor de metástasis de células tumorales, mediante la adhesión de estas, a través de su secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) en su dominio C1 (Ping et al., 2012).

4.1.4 Factor de Von Willebrand: las dos caras de una proteína.

Como se ha venido mencionando, el FvW es una proteína única en términos de su estructura multimérica y los mecanismos inusuales de su participación en la regulación de diversos procesos dentro y fuera de la hemostasia (Lenting, Casari, Christophe, 2012).

El desarrollo y refinamiento de la metodología electroforética nos ha permitido conocer con más detalle la estructura íntima de la molécula del factor von Willebrand en condiciones dentro y fuera de la enfermedad de von Willebrand (Batlle, 1993).

Una disminución en los Multímeros de alto peso molecular (MAPM) conlleva a un padecimiento conocido como Enfermedad de Von Willebrand (EvW), descrita en 1926 en Finlandia por el doctor Erich Von Willebrand como un trastorno hemorrágico hereditario diferente a la hemofilia (Espitia, 2010). Esta patología constituye un grupo heterogéneo de padecimientos en los que la estructura, función y concentración del factor de von Willebrand están alteradas (Hernández et al., 2014). Es el trastorno hemorrágico más común en los seres humanos, con una distribución de escala mundial y sin predominio de sexo y, debido a que a menudo los síntomas son leves, una considerable mayoría de pacientes permanece sin diagnosticar (Lillicrap & James, 2009)(Martínez & Quintana, 2008) (Sadler, 2005).

La característica central de todos los tipos de EvW es la presencia de alteraciones cuantitativas o funcionales de FvW en el torrente sanguíneo (Lillicrap & James, 2009)(Espitia, 2010). Alteraciones cuantitativas en las que la concentración se encuentra deficiente pero funcional (tipo 1 y 3), y alteraciones cualitativas en las que el factor es disfuncional con concentraciones variables, aunque no necesariamente disminuidas (tipo 2A, 2M, 2N, 2B).

Una pequeña disminución en la concentración del FvW en plasma conlleva la pérdida selectiva de multímeros de alto peso molecular, disminuyendo de esta forma la adherencia plaquetaria con la consecuente aparición de hemorragia (Espitia, 2010).

Por otro lado, un incremento en la concentración de FvW y por consiguiente multímeros de alto peso molecular provocara que la proteína sea demasiado adhesiva. La ausencia congénita o adquirida de ADAMTS13 es responsable de la presencia plasmática de multímeros de FvW excesivamente grandes, que inducen agregación plaquetaria, y desencadena la crisis oclusivas que caracterizan a la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (Figura 8) (V. García, 2004)(Lillicrap, 2008)(Sadler, 2005).

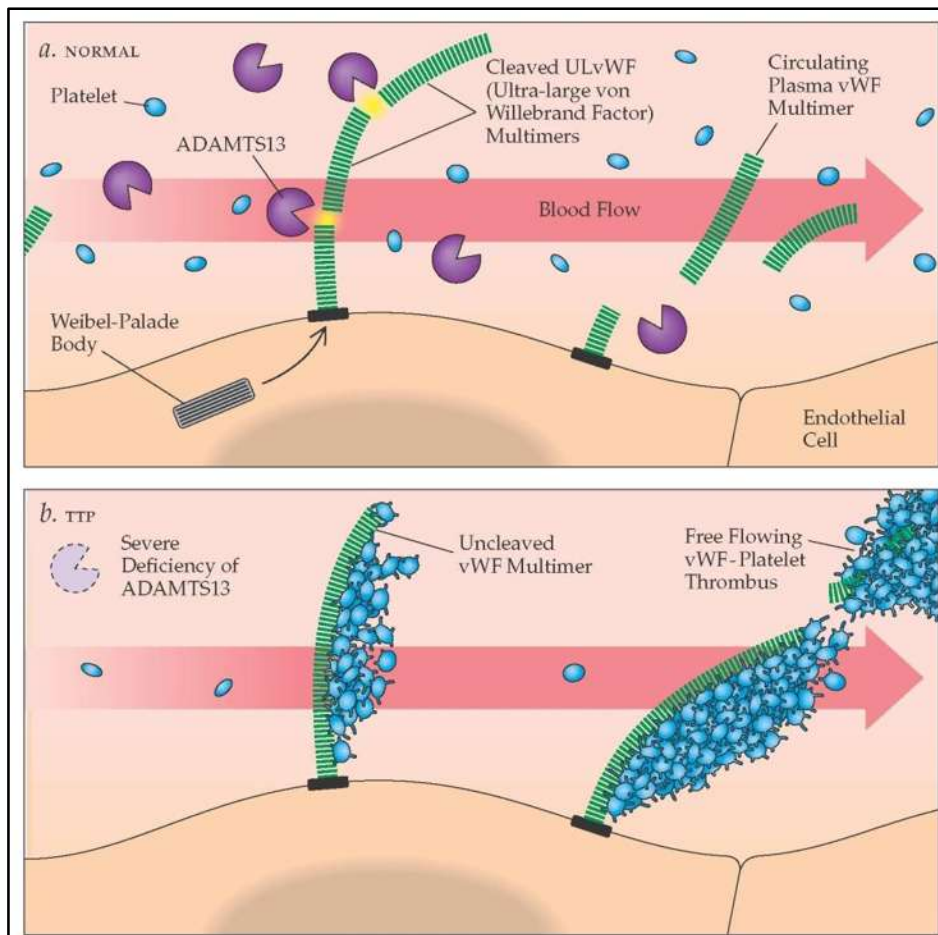


Figura 8: Funcionalidad del ADAMTS-13 en la regulación del tamaño del FvW:

- c) Función en hemostasia normal.
- d) Deficiencia de ADAMTS-13 en PTT.

4.1.5 Factor de von Willebrand asociado a diversas patologías.

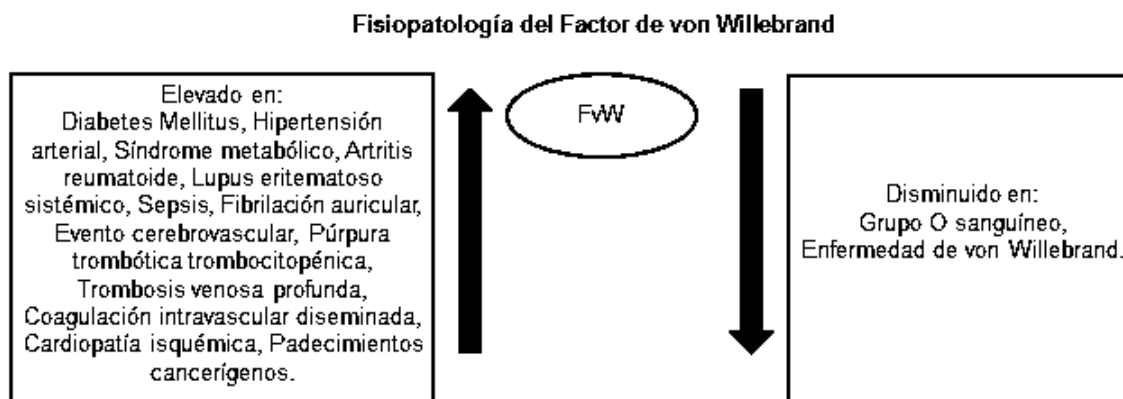


Figura 9: Elevación y disminución del Factor de von Willebrand en diversas patologías.

El FvW ha sido señalado como un indicador de lesión o disfunción endotelial (Virgos, Nebra, 2004)(Virgos, Nebra, Suárez, Cornudella, 2008), fundamentado en que todos aquellos factores de riesgo cardiovascular, cuya acción crónica sobre la pared arterial que determinen un daño del endotelio que recubre los vasos son causas bien conocidas de elevación de los niveles plasmáticos de FvW como consecuencia de la activación y proliferación que se genera en ellos, siendo los más representativos diabetes mellitus, hipertensión arterial, fallo hepático, insuficiencia renal (Gil et al., 2003) y cardiopatía isquémica (CI), aumentado más significativamente tras el intervencionismo coronario, ya que la lesión endotelial es el substrato fisiopatológico estos pacientes (Virgos, Nebra, Suárez, Cornudella, 2008)

Todos aquellos eventos de carácter inflamatorio agudo o crónico estimulan la producción exacerbada del FvW por parte de endotelio y plaquetas, dentro de este subgrupo causal destacan la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y las alteraciones del tejido conectivo en general (Gil et al., 2003).

Debido a su capacidad para promover la adhesión y agregación plaquetaria, también es un componente crítico en estados de hipercoagulabilidad y formación de trombos vasculares como en trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, coagulación intravascular diseminada, sepsis, evento cerebrovascular isquémico, púrpura trombótica trombocitopénica y síndrome urémico hemolítico, que generan elevación secundaria intensa de los niveles plasmáticos de FvW (Figura 9) (Gil et al., 2003)(Lenting, Casari, Christophe, 2012).

En padecimientos cancerígenos también se han encontrado concentraciones plasmáticas elevadas del FvW, la adhesión celular mediada por este factor y las integrinas de membrana en plaquetas, células endoteliales y células tumorales ha demostrado agregación plaquetar, coagulación inducida por tumor y capacidad migratoria de las células neoplásicas en la generación de metástasis (Gil et al., 2003).

4.1.6 Factor de von Willebrand y Artritis Reumatoide.

El desarrollo de una lesión endotelial implica la liberación del FvW de las células endoteliales, por otro lado, la concentración plasmática de este factor se ve incrementada en respuesta a estímulos patológicos como inflamación y tanto inflamación como lesión endotelial son componentes clave en la fisiopatología de la Artritis reumatoide.

Por lo tanto, diversos estudios han encontrado concentraciones elevadas del FvW en esta patología articular inflamatoria (Mcentegart et al., 2001)(Fenling et al., 2014).

4.2 DAS 28.

El DAS 28 (Disease Activity Score en 28 articulaciones) es un índice compuesto que mide la actividad de la Artritis Reumatoide, incorporando VSG (Velocidad de Sedimentación Globular), número de articulaciones dolorosas (0-28), numero de articulaciones inflamadas y evaluación de la gravedad de la AR medida por el paciente en una escala visual análoga (EVA 0-100). La fórmula para sacar la puntuación es $DAS\ 28 = 0.56 (\sqrt{\text{numero de articulaciones dolorosas}}) + 0.28 (\sqrt{\text{numero de articulaciones inflamadas}}) + 0.70 (\ln VSG) + 0.014 (\text{estado general del paciente})$.

Un resultado menor o igual a 2.6 indica remisión de la enfermedad, entre 2.6 a 3.2 enfermedad con baja actividad, entre 3.2 a 5.1 enfermedad con moderada actividad y mayor a 5.1 es una enfermedad muy activa (Svrbely & Emery, 2009).

Por su parte, la Escala Visual Análoga (EVA 0-100): prueba que consiste en preguntar al paciente como se encuentra su estado general en ese momento, se le explica que cero es como si no se presentara síntomas de la Artritis Reumatoide, tales como dolor o inflamación articular y 100 la mayor sintomatología posible.

4.3 Artritis Reumatoide.

4.3.1 Definición.

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica, de etiología desconocida, caracterizada por la inflamación de la membrana sinovial y destrucción progresiva del cartílago articular y hueso, con alteraciones estructurales, dolor y limitación funcional (Sánchez, López, & Carreño, 2011).

Esta patología constituye un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia, a sus graves consecuencias funcionales y al alto impacto económico y social. En México, se estima que afecta al 1,6% de los adultos mexicanos y es más prevalente en mujeres, con una relación de 6:1, afectando principalmente al grupo etario con mayor capacidad laboral y productiva (Cardiel et al., 2014).

Existen factores genéticos predisponentes que se asocian con mayor frecuencia en la patogénesis de la Artritis Reumatoide, entre los que se encuentran los alelos de los antígenos leucocitarios humanos (HLA)-DR1 y -DR4 (Ortiz, Arévalo, & Rosales, 2010)(McInnes & Schett, 2007), y el epítipo compartido, secuencia compuesta por 5 aminoácidos, QKRAA (Gln-Lis-Arg-Ala-Ala), cerca de la región de la cadena DR β que enlaza al péptido, esta estructura puede interactuar con el receptor de la célula T (TCR) y resultar en la activación de esta célula (Ortiz et al., 2010).

4.3.2 Fisiopatología.

La afección en la articulación reumatoide tiene 3 componentes principales:

1. Procesos autoinmunes.
2. Destrucción del cartílago, hueso y articulaciones.
3. Inflamación articular crónica (Figura 10).

La membrana sinovial es un tejido bien vascularizado que sella la articulación y asegura la presencia de fluidos que lubrican el espacio de la articulación. La inflamación de la membrana sinovial es la principal alteración de la enfermedad, se caracteriza por la formación de hipertrofia (aumento del volumen de las células) e hiperplasia (aumento del volumen y del número de células) de las células de la membrana sinovial.

Macroscópicamente la membrana sinovial aparece aumentada de tamaño y edematosa. La extensión de la proliferación sinovial sobre el cartílago, se denomina pannus, que rompe la cortical en la zona de la unión cartílago sinovial y erosiona el

hueso subcondral. Estas alteraciones óseas, unidas a la pérdida del cartílago, conducen a la destrucción de las superficies articulares (Duró, 2010).

Microscópicamente, el sitio primario de activación inmune está en la articulación (Palomo, Ferreira, Sepúlveda, Roseblatt, 2009), se produce una infiltración de macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares, linfocitos T y B (Espondaburu, Alicia, Hunt, & Ocampo, 2004), entre las que los linfocitos Th17, secretores de la citocina con mayor efecto proinflamatorio, la interleucina (IL-17), parecen desempeñar un papel iniciador (Oliva, Martínez, Zapata, & Sánchez, 2012)(Ortiz et al., 2010), interaccionando con células dendríticas (CD), macrófagos y linfocitos B (Sánchez et al., 2011).

Los macrófagos son células fundamentales en la fisiopatología, constituyen alrededor del 20% de las células de la membrana sinovial y producen un exceso de mediadores proinflamatorios claves, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL1, implicadas en la perpetuación de la inflamación crónica en la AR, ya que contribuyen a la degradación de la matriz extracelular, a la destrucción cartilaginosa y a la resorción ósea (Sánchez et al., 2011)(Duró, 2010).

Los fibroblastos sinoviales adquieren un fenotipo pseudomaligno.

Los linfocitos B actúan mediante la producción de autoanticuerpos, como células activadoras de los linfocitos T en su función de células presentadoras de antígeno (APC) y de activación de fibroblastos mediante la secreción de TNF y linfoxina. Se produce una activación e hiperplasia de los mastocitos a nivel articular. El tejido inflamatorio o pannus adquiere la capacidad de invadir y destruir el cartílago articular adyacente. La activación de los osteoclastos del hueso periarticular conduce a la resorción y se forman las erosiones óseas características de la enfermedad (Sánchez et al., 2011).

Los linfocitos T constituyen el 50% del total de las células sinoviales, con un claro predominio de los linfocitos CD4⁺ (Duró, 2010). La activación de los linfocitos T inicia la producción de citoquinas, los CD4 se diferencian en dos clases funcionales: los TH1 que producen moléculas pro inflamatorias (TNF- α) que median la hipersensibilidad retardada; y los TH2 que producen IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10 las cuales intervienen en la diferenciación de células B y su activación. Se ha evidenciado el incremento en la apoptosis del tejido sinovial (Acon, Zapata, & Méndez, 2012).

La degradación del cartílago determina la deformación de la articulación con pérdida de su funcionalidad (Espondaburu et al., 2004).

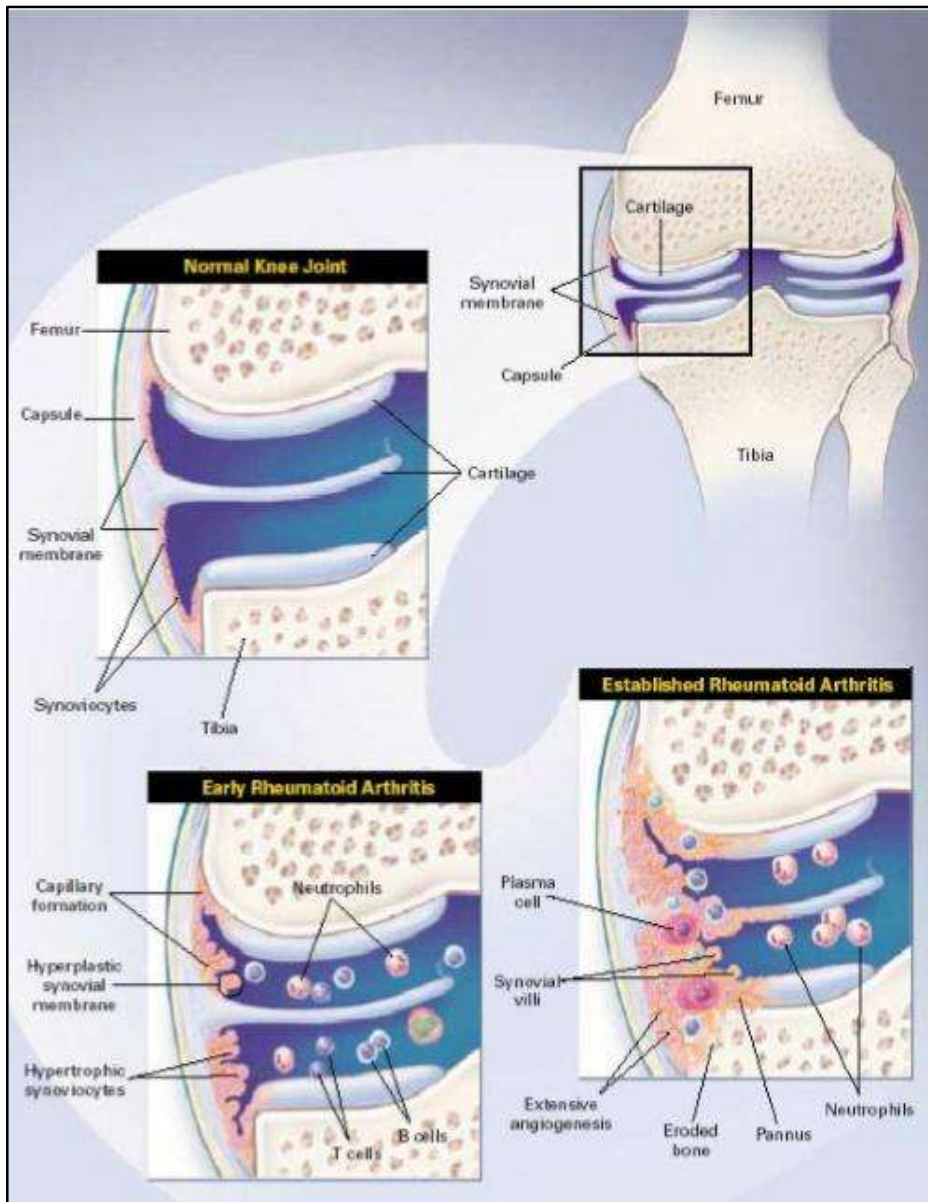


Figura 10:

Fisiopatología de la artritis reumatoide.

El tratamiento de la artritis reumatoide se dirige a disminuir la actividad inflamatoria y evitar la progresión de la lesión articular (González et al., 2004). Utilizando antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), corticoesteroides y fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME) (Acon et al., 2012), los cuáles se clasifican en biológicos y no biológicos. De los no biológicos el Metotrexato (MTX) es el fármaco de primera elección. Los FARME biológicos son un grupo de fármacos antagonistas de determinadas citocinas que intervienen en la etiopatogenia de la AR (TNF- α , IL1, etc.) (Duró, 2010).

4.3.3 Riesgo cardiovascular y aterosclerosis en Artritis Reumatoide.

La enfermedad cardiovascular es un problema frecuente e insuficientemente reconocido en pacientes con trastornos reumáticos. Las enfermedades reumáticas son trastornos inflamatorios autoinmunitarios que afectan a múltiples órganos y con frecuencia producen alteraciones en los vasos sanguíneos y el corazón (Villa-forte & Mandell, 2011), y esto representa, en ocasiones, un peor pronóstico y una mayor mortalidad que la propia incapacidad funcional articular (Duró, 2010).

La subestimación del riesgo cardiovascular en AR podría ocurrir en parte debido a la alta prevalencia de aterosclerosis asintomática en este grupo de pacientes (Nurmohamed, Heslinga, & Kitas, 2015).

La afección cardíaca en artritis reumatoide incluye pericarditis, valvulitis, miocarditis y un aumento de la prevalencia y muerte prematura por enfermedad coronaria aterosclerótica, así como un incremento del riesgo de Enfermedad Cardiovascular (Villa-forte & Mandell, 2011).

El riesgo de infarto de miocardio en pacientes con artritis reumatoide es mayor (alrededor de 68%) que de accidente cerebrovascular (alrededor del 41%) (Nurmohamed et al., 2015), y hasta el 35-50% de las muertes en AR son por Enfermedad cardiovascular (McIntegart et al., 2001). Los mecanismos patogénicos y la expresión clínica de comorbilidades cardiovasculares varían mucho entre las diferentes enfermedades reumáticas, pero la aterosclerosis parece estar asociada a todas las enfermedades inflamatorias de las articulaciones (Nurmohamed et al., 2015).

El aumento de la prevalencia de la mortalidad cardiovascular en la AR es consecuencia de la aterosclerosis acelerada, relacionada con la lesión de la pared endotelial a causa de la inflamación crónica e independiente de los seis factores tradicionales de riesgo cardiovascular (**Tabla 2**) (Duró, 2010).

Factores tradicionales de riesgo cardiovascular en Artritis Reumatoide	
Obesidad	Conseguir un Índice de Masa Corporal (IMC) < 25 Kg/m ²
Hipertensión Arterial (HTA)	Conseguir una presión arterial (PA) < 130/80 mmHg con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA)
Diabetes	----
Hipercolesterolemia	Colesterol de baja densidad (LDL) < 100 mg/dl con estatinas
Tabaquismo	----
Sedentarismo	----

Tabla 2: Factores tradicionales de riesgo cardiovascular en Artritis Reumatoide (Duró, 2010).

Además de los factores de riesgo tradicional, la inflamación es un importante contribuyente independiente para riesgo cardiovascular, siendo el mayor influyente de aterosclerosis acelerada (**Figura 11**) (Nurmohamed et al., 2015).

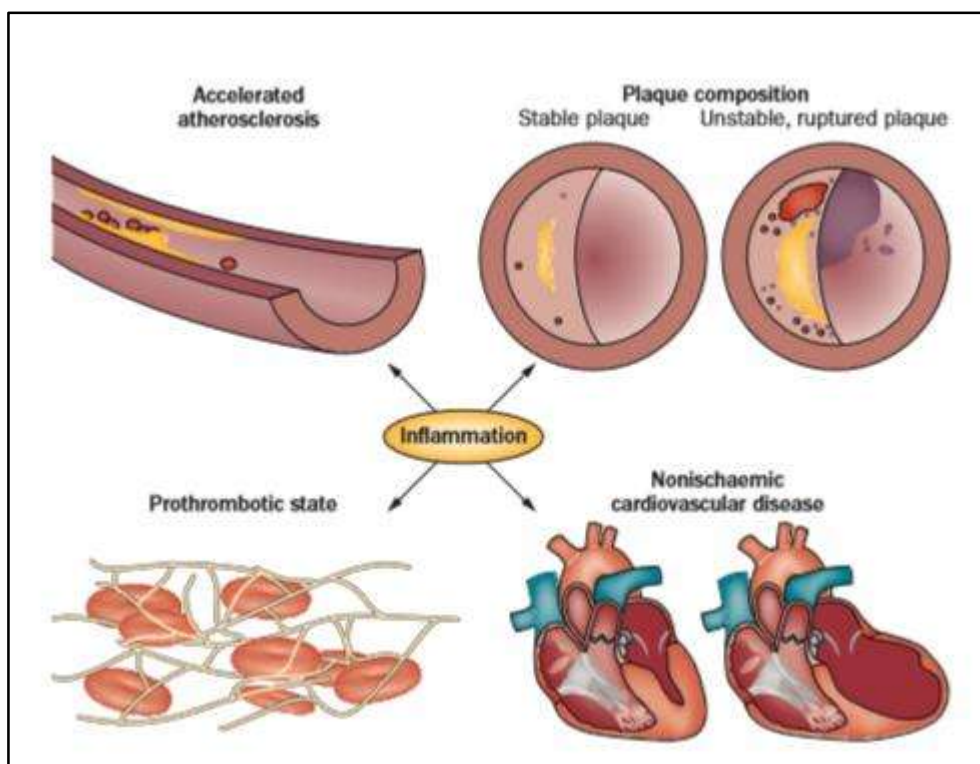


Figura 11: La inflamación como catalizador de enfermedad cardiovascular en artritis reumatoide (Nurmohamed et al., 2015).

El análisis de los mecanismos que conllevan al desarrollo de una aterosclerosis prematura y/o acelerada en Artritis reumatoide permite establecer similitudes entre la aterogénesis y los procesos inflamatorios crónicos que caracterizan a esta enfermedad:

- Incremento en la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas y factores de crecimiento.
- Aumento del reclutamiento celular.
- Liberación de enzimas hidrolíticas.

Por lo tanto, la aterosclerosis puede ser considerada como una enfermedad inflamatoria crónica a nivel de la pared vascular, caracterizada por el depósito lipídico, que comienza con la activación endotelial causada por las LDL oxidadas o por un proceso inflamatorio crónico (**Figura 12**).

Los factores que contribuyen a acelerar el proceso aterogénico en AR están relacionados con un estado protrombótico, caracterizado por trombocitosis y elevados niveles de fibrinógeno, factor von Willebrand y PAI-1, que lleva a un depósito persistente de fibrina sobre el endotelio vascular, que actúa como estímulo para su activación (Espondaburu et al., 2004).

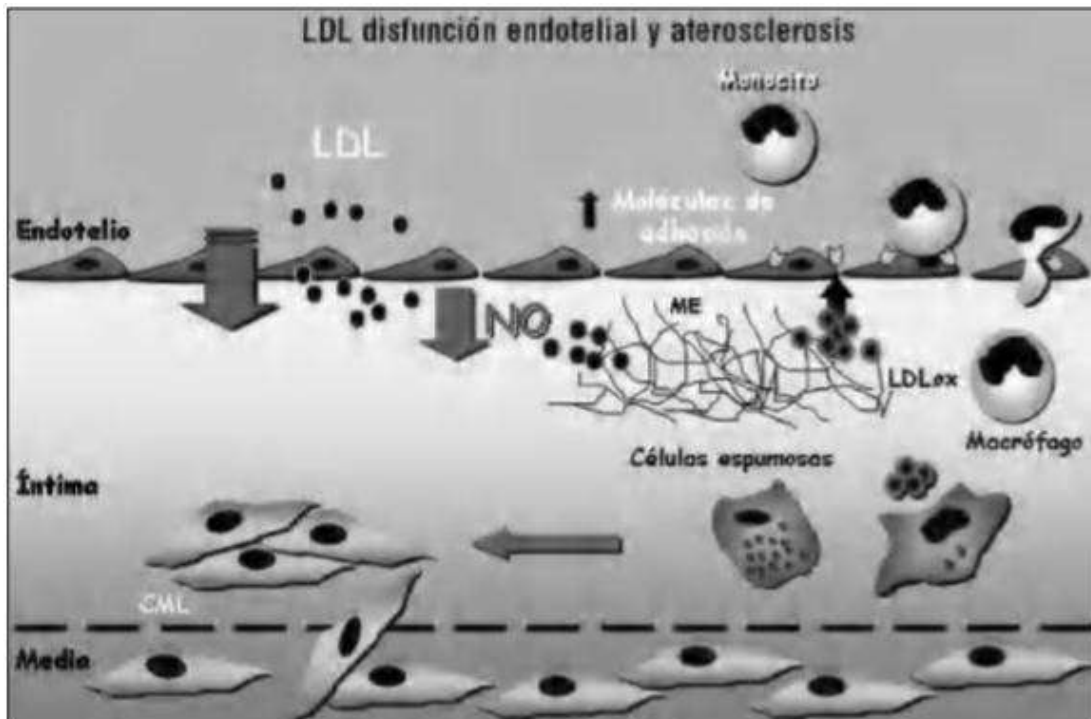


Figura 12: Disfunción endotelial y aterosclerosis.

Efectos de las lipoproteínas de baja densidad en el endotelio vascular (Badimón & Martínez, 2006).

4.4 Riesgo cardiovascular en Artritis Reumatoide y Factor de von Willebrand.

En respuesta a estímulos patológicos como inflamación, la concentración plasmática del FvW se incrementa rápidamente. Los niveles plasmáticos elevados de FvW han sido considerados como un riesgo de trombosis ya que han sido encontrados en diversas patologías cardiovasculares tales como enfermedad arterial coronaria, cardiopatía isquémica, trombosis venosa y cerebral, fibrilación auricular, coagulación intravascular diseminada, evento cerebro vascular isquémico, etc. (Ping et al., 2012).

La artritis reumatoide, a pesar de ser una enfermedad articular, se caracteriza por un estado proinflamatorio, aterosclerosis acelerada e incremento de la incidencia de complicaciones cardiovasculares, que parecen ser consecuencia de una inflamación crónica y la presencia de disfunción endotelial. La vasculitis en pacientes con AR puede aumentar los niveles en plasma del FvW mediante la inducción de perturbación endotelial vascular, que puede ser protrombótico (McIntegart et al., 2001).

El daño endotelial expone la matriz subendotelial vascular y su contenido. El FvW juega un rol importante en la iniciación de la agregación y adhesión plaquetaria sobre la matriz extracelular (Ping et al., 2012).

Por lo tanto, vislumbramos una relación clara entre; secreción endotelial aumentada de FvW, por una parte, y adhesión y agregación descontrolada a plaquetas y subendotelio mediada por factor von Willebrand, por otra (Gil et al., 2003) (**Figura 13**).

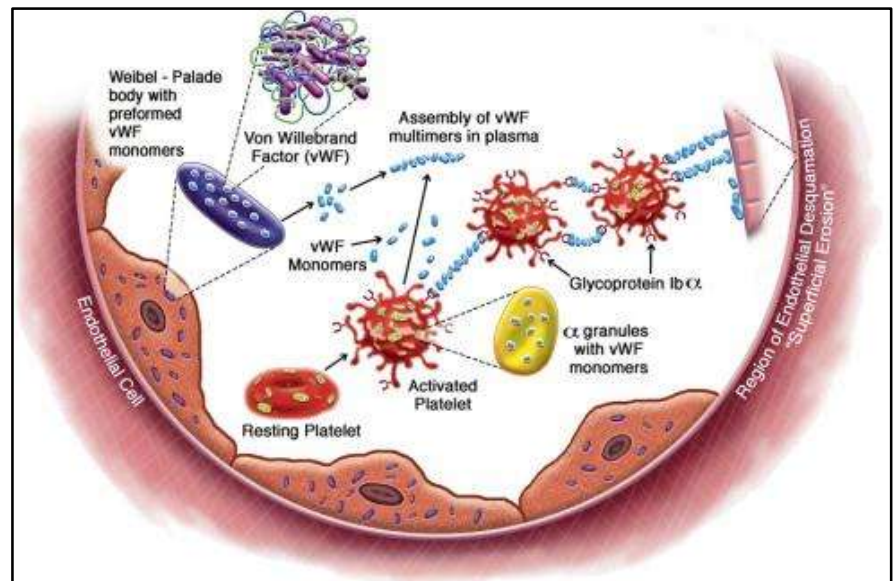


Figura 13:

Liberación endotelial, agregación y adhesión plaquetaria mediada por FvW.

4.5 Factor de von Willebrand y Anoikis.

La disfunción endotelial se define como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predisponen a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo de aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis (Badimón & Martinez, 2006).

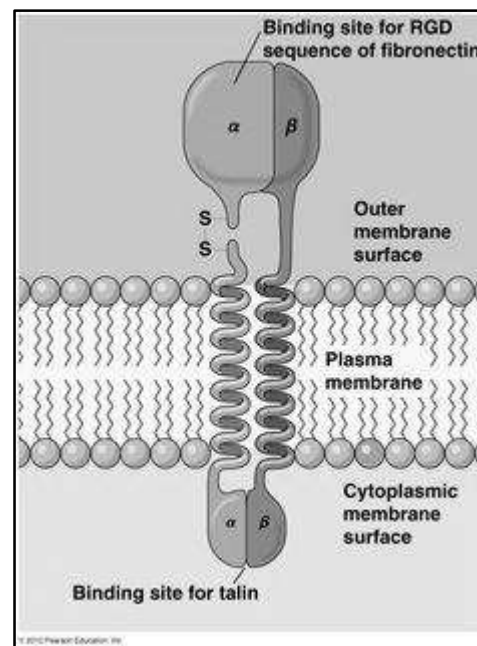
La apoptosis incrementa en el tejido sinovial de pacientes con Artritis reumatoide, donde el endotelio presta el escenario y participa activamente en la respuesta inflamatoria y en el fenómeno inmunológico, es decir; es blanco pero también elemento activo en este proceso patológico.

La anoikis es la apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular (MEC) o porque las interacciones célula-matriz son insuficientes o inadecuadas (Frisch & Screaton, 2001). En este proceso, participan las integrinas que son glucoproteínas integrales de la membrana plasmática que median una gran variedad de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular e intervienen en la adhesión celular, migración, organización del citoesqueleto y transducción de señales (Figura 15)(Batlle, 1993).

Las integrinas son proteínas heterodiméricas que promueven la supervivencia celular a través de la adhesión focal (AF) (adhesión entre la MEC y la célula). Están compuestas por dos glicoproteínas transmembrana α y β no asociados covalentemente. Estas proteínas reconocen y se unen a ligandos a través de secuencias de tripéptidos contiguos denominados RGD (Arg, Gly, Asp). La secuencia RGD reconoce receptores de entre otras proteínas el FvW (Figura 14)

(Fanelli et al., 2014)(Batlle, 1993).

Figura 14: Estructura de una integrina, se muestra su secuencia RGD que reconoce receptores para fibrinógeno, fibronectina, FvW, entre otras proteínas.



El FvW se une por medio de la secuencia RGD con las integrinas GP Ib-IX y GP IIb-IIIa para llevar a cabo las funciones de adhesión y agregación plaquetaria(Batlle, 1993).

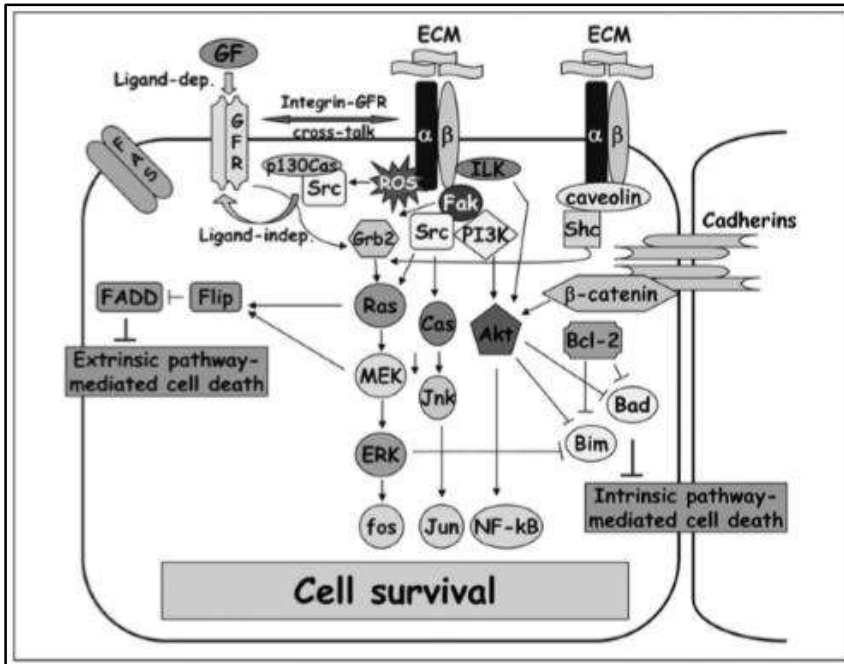


Figura 15: La unión de las integrinas de las células endoteliales con la matriz extracelular activa varias rutas de supervivencia incluyendo ERK, JNK y Akt, que inhiben proteínas pro-apoptóticas (Chiarugi & Giannoni, 2008).

La apoptosis es un proceso controlado desencadenado por:

- Señales extrínsecas: activación de receptores de muerte de la superficie celular (receptores FAS, TNF).
- Señales intrínsecas: activación de caspasas como consecuencia de la permeabilización mitocondrial.

Ambas vías intrínseca y extrínseca convergen en la activación de la caspasa 9, que activa la caspasa 3, que inicia la cascada proteolítica en el torrente sanguíneo y que es el evento central en la muerte celular programada (Chiarugi & Giannoni, 2008).

Varios estudios han indicado que la anoikis procede a través de la vía intrínseca, las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak se activan después de la separación de las células de la matriz extracelular, lo que indica que la adhesión celular puede regular los miembros anti-apoptóticos (Gilmore, 2005) (Chiarugi & Giannoni, 2008). Después de la pérdida de inserción de las células endoteliales a la MEC, Bax se transloca del citosol a la membrana mitocondrial externa (OMM), esto se acompaña de la exposición de los epítomos N-terminal indicativos del cambio de la conformación inactiva a proapoptótica (Gilmore, 2005).

La vía intrínseca o mitocondrial depende del balance de actividad entre señales pro y anti-apoptóticas de proteínas de la familia Bcl-2, las cuales regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y determinan qué tipo de señal será liberada en la célula (Lizarbe, 2007).

En resumen, la familia Bcl-2 se describe en dos tipos de proteínas:

- Anti-apoptóticas (Bcl-2).
- Pro-apoptóticas: familia Bax (Bax, Bak) y solo BH3 (Bid, Bim, Bmt, Bad, etc.).

Estas proteínas cuentan en su estructura con dominios BH los cuales les confieren la capacidad de interactuar entre ellas. Las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 están estructuralmente relacionadas con las familias pro-apoptóticas Bax y solo BH3 pero previenen la apoptosis por que mantienen la integridad de la membrana mitocondrial (Chiarugi & Giannoni, 2008).

En anóikis, la pérdida del contacto con MEC lleva a la inhibición de las señales p13k/Akt y ERK incrementando la sobreexpresión de Bim, miembro de la familia pro-apoptótica BH3, proteínas que pueden activarse por ruptura proteolítica o fosforilación, unirse e inhibir a las proteínas anti-apoptóticas y así promover la apoptosis. En particular los miembros Bid y Bim se activan después de la separación de las células de la MEC y activan directamente Bax y Bak, proteínas pro-apoptóticas que actúan en la formación de poros que incrementan la permeabilidad mitocondrial y permiten la liberación de factores apoptogénicos como citocromo c, calcio y especies reactivas de oxígeno (ROS), etc. **(Figura 16)** (Chiarugi & Giannoni, 2008)(Lizarbe, 2007).

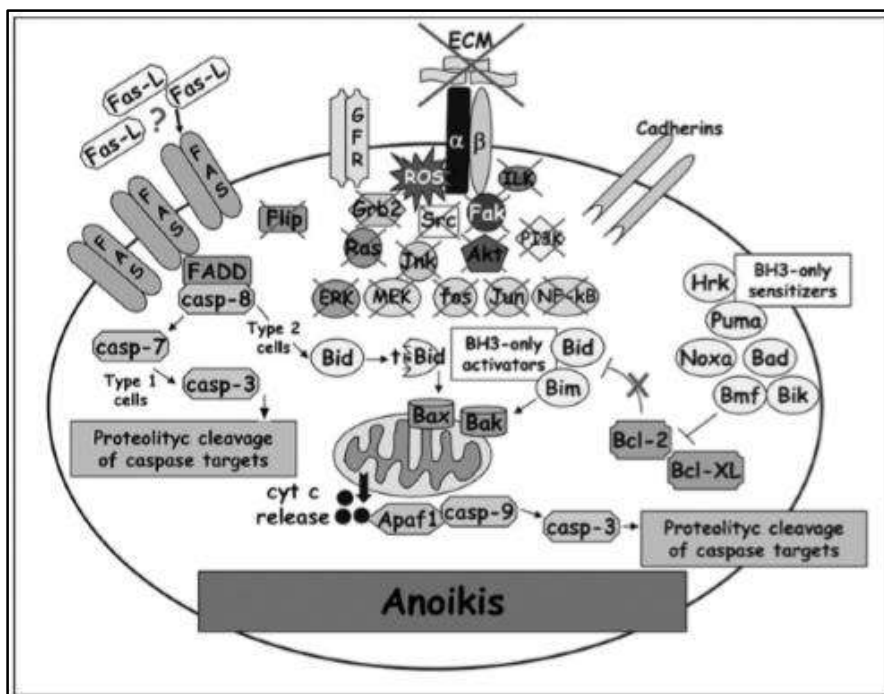


Figura 16: La falta de contacto celular mediado por MEC, impide la acción de las señales de supervivencia, dejando que actúen las proteínas pro-apoptóticas y causando anoikis (Chiarugi & Giannoni, 2008).

Se le han atribuido al FvW posibles propiedades pro-apoptóticas a plaquetas, inducidas a través del eje FvW - GPIB, por esta misma vía que implica la caspasa- 3, Bak, y Bax, ya que los eventos de señalización desencadenada por la interacción FvW-GPIB, tales como la movilización del calcio y la exposición de fosfatidilserina (PS) son similares a los que ocurren durante la apoptosis. Hasta ahora, la mayoría de los eventos apoptóticos de plaquetas se han considerado a surgir de la vía intrínseca o mitocondrial, regulado por proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticos (Bax y Bak) y anti-apoptótico (Bcl-2 y Bcl-XL) (Li, Wang, & Liao, 2009).

La Anoikis se inhibe por la sobreexpresión de Bcl-2 (Gilmore, 2005), esta proteína anti-apoptótica se localiza en la membrana mitocondrial externa y ejerce su actividad interaccionando e inhibiendo a proteínas pro-apoptóticas (Lizarbe, 2007), está regulada por moléculas de señalización tales como FAK , Shc y Akt que responden a integrinas específicas (Frisch & Screaton, 2001).

En resumen, los mecanismos intracelulares de anoikis implican el efecto de PI3K / Akt en la adhesión focal y quinasas integrina-ligadas (FAK , Shc, ILK) , impedimento de la señalización de Raf- ERK y quinasas jun N -terminal , represión de bcl - 2, ligando FAS, y la activación de caspasas (Jean-baptiste, 2003)(Frisch & Screaton, 2001).

5. Justificación.

Las enfermedades autoinmunes, entre otras, la Artritis Reumatoide (AR) se caracterizan por presentar un estado inflamatorio crónico y sistémico, aunado a este, los pacientes desarrollan un proceso de aterosclerosis acelerada e incremento de la incidencia de complicaciones cardiovasculares. La enfermedad cardiovascular supone un 35-50% de la mortalidad en estos pacientes. En los últimos años se ha demostrado como la AR se asocia a una elevada morbilidad cardiovascular, que no puede explicarse solamente por la presencia de los factores tradicionales de riesgo aterosclerótico. El FvW se ha evaluado como un factor de riesgo no tradicional de riesgo cardiovascular, ya que han sido encontradas concentraciones plasmáticas elevadas de este factor en esta enfermedad autoinmune, sin embargo, el FvW ha sido estudiado en la Artritis Reumatoide únicamente en cuanto a su concentración plasmática mientras que en esta enfermedad, no existen estudios que aborden su estructura molecular.

6. Objetivo general:

Estudiar las concentraciones plasmáticas y estructura multimérica del FvW como biomarcador de riesgo cardiovascular en pacientes con Artritis Reumatoide.

6.1 Objetivos específicos:

1. Integrar un estudio de cohorte, casos y controles, comparativo, prolectivo, transversal.
2. Determinar en los pacientes y controles las concentraciones plasmáticas de FvW
3. Llevar a cabo el estudio de los multímeros del FvW por Inmunoelctrotransferencia (Western blot) en geles de agarosa-SDS.
4. Correlacionar los resultados obtenidos de concentraciones plasmáticas y análisis multimérico con parámetros clínicos, principalmente riesgo cardiovascular y actividad clínica de la enfermedad determinada por DAS28.

7. Material y Métodos.

7.1 Universo o población.

Pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide que acudieron a consulta programada al servicio de Reumatología del Hospital General Regional #1 (HGR #1) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

7.2 Muestra.

Se incluyeron en el estudio a un total de 30 pacientes con Artritis Reumatoide en estado activo que acudieron al servicio de Reumatología del HGR #1 del IMSS y 20 controles sanos que aceptaron participar en el estudio y firmaron carta de consentimiento informado.

Se formaron 2 grupos de estudio:

- Casos: pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide (30 pacientes) en estado activo definido por Escala de Actividad DAS 28>2.6.
- Controles: individuos sanos pareados por edad y género con los pacientes del grupo de estudio (20 sujetos).
Completando una muestra total de 50 pacientes.

7.3 Diseño experimental.

Tipo de estudio: estudio de cohorte, casos y controles, comparativo, prolectivo, transversal.

7.4 Criterios de inclusión.

- Pacientes de 18 a 70 años de edad.
- Pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide en estadio activo (DAS 28 > 2.6).
- Pacientes con un perfil lipídico normal, sin antecedentes de Enfermedad Cardiovascular (ECV).
- Pacientes que se encontraron bajo tratamiento convencional o terapia biológica sin haberla suspendido.
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

7.5 Criterios de exclusión.

- Pacientes con enfermedades autoinmunes agregadas.
- Pacientes con diagnóstico clínico de Diabetes Mellitus.
- Pacientes con ECV documentada.
- Pacientes que se encontraron recibiendo terapia con estatinas.
- Pacientes oncológicos.
- Pacientes con AR en estado de remisión.
- Pacientes fumadores.
- Pacientes con obesidad.

7.6 Criterios de eliminación.

- Pacientes cuyas muestras biológicas no hayan sido procesadas o almacenadas en las condiciones idóneas y por lo tanto no aseguren su calidad biológica.
- Pacientes cuyas muestras sanguíneas resultaron lipémicas o hemolizadas.
- Pacientes que no estuvieron dispuestos a participar ni a firmar el consentimiento informado.

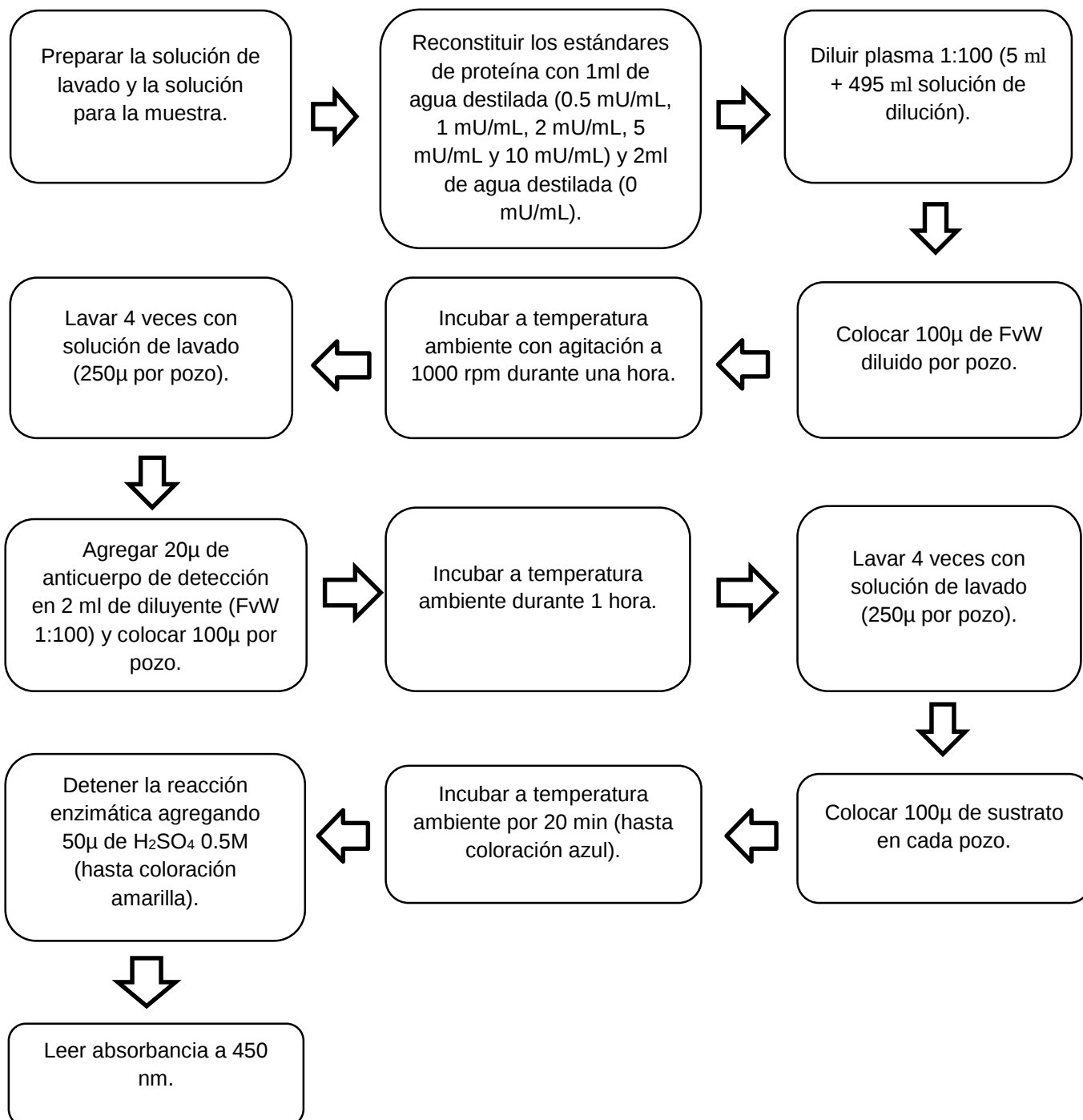
7.7 Toma de muestra.

El estudio se realizó en coordinación con la consulta externa del servicio de Reumatología y el laboratorio del HGR # 1 IMSS. Los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, se les invitó a participar, después de aceptar la invitación y firmar consentimiento informado. En todos los participantes se realizó historia clínica: con énfasis en el interrogatorio de factores de riesgo cardiovascular y la medición de presión arterial, talla, peso, índice de masa corporal, circunferencia abdominal. Se realizó toma de muestra de sangre periférica mediante venopunción de antebrazo con sistema vacutainer de recolección al vacío, se obtuvo suero y plasma por centrifugación para realizar; Biometría hemática completa, Velocidad de sedimentación globular, Proteína C reactiva, Perfil de lípidos y Química sanguínea de tres elementos (Glucosa, Urea, Creatinina). Se cuantificaron las concentraciones plasmáticas del FvW por ELISA y el análisis de la estructura multimérica mediante Western Blot en plasma pobre en plaquetas obtenido con citrato de sodio al 3.2%, centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos.

7.8 Metodología.

7.8.1 Determinación de la concentración plasmática de FvW por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Este procedimiento fue realizado mediante un kit de ELISA FvW IMUBIND® (American Diagnostica, USA).



7.8.2 Estudio de los multímeros del FvW por medio de Inmunoelectrotransferencia (Western blot) en dodecil sulfato de sodio (SDS) en geles de agarosa.

Esta metodología es una adaptación del método de SDS-PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida- dodecilsulfato de sodio) descrito por Laemmli en 1970 y modificada en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la UMNSH (López, Godínez, Gutiérrez, Areán, & Viveros, 2013). Se trata de un tipo de electroforesis en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes. Se utiliza el dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente iónico que disocia las moléculas oligoméricas en subunidades, permitiendo el análisis del FvW sin necesidad de la desnaturalización (reducción) previa de la proteína (Ledford-kraemer, 2010), ya que los multímeros adquieren carga uniforme, en consecuencia, su separación electroforética depende sólo de su tamaño (Hernández et al., 2014).

Se emplea un sistema de dos soluciones amortiguadoras (discontinuo). Este sistema permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución (obteniendo bandas más compactas). El primer gel (Concentrador) asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo, es de mayor poro y tiene un pH más ácido que el otro gel. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo gel (Corrimiento), que es el que realmente separa las proteínas. Se añade a la muestra un colorante marcador, molécula cargada y de pequeño tamaño que avanza más que cualquier componente de la muestra; nosotros usamos azul de bromofenol.

Por medio de esta técnica se evalúa la composición multimérica del Factor de Von Willebrand (Hernández et al., 2014) y así los multímeros se analizan mediante la visualización de sus estructuras no reducidas posterior a la electroforesis en gel de agarosa (Ledford-kraemer, 2010).

7.8.2.1 Electroforesis en geles de agarosa 1.8%- 1%.

Se limpian perfectamente los cristales con solución de SDS al 1% y después con etanol absoluto. Se ensamblan y se montan. Se prepara el gel de corrimiento al 1.8% con 0.126g de agarosa en 7 ml de buffer de corrimiento (Ver anexo II) para un gel. Se prepara el gel concentrador al 1% con 0.02g de agarosa en 2 ml de buffer concentrador (Ver anexo II) para un gel. Se calienta la agarosa hasta ebullición y disolución en su respectiva solución y se vacía evitando burbujas, se coloca primero el gel de corrimiento y arriba el gel concentrador. Se coloca peine. Se deja solidificar en refrigeración. Se utiliza una cámara para electroforesis vertical (Ver anexo I).

7.8.2.2 Preparación de la muestra.

Se realiza una preparación con 80 microlitros (μ) de solución de dilución de la muestra (SDM), 10 μ de azul de bromofenol al 1% y 20 μ de plasma. Se incuba esta preparación a baño maría a 70° durante 15 min para inactivar cualquier proteasa presente en la muestra que pueda producir productos de degradación que den lugar a bandas no auténticas (Ledford-kraemer, 2010).

Se carga la cantidad de microlitros en los pozos de acuerdo a cada muestra, esto mediante la siguiente formula desarrollada en el laboratorio de hemostasia y biología vascular a partir de la concentración plasmática del FvW obtenida mediante ELISA:

$$\left[\frac{(\text{FvW UI/ml})}{(1000)} \times (20) \times (10) \right] \div 110 = X$$

$$Y = \frac{0.217}{X}$$

Y= cantidad de muestra en μ a cargar.

- X= cantidad de UI de FvW presentes en 10 μ .
- 1000: para obtener la cantidad de UI en 1 μ .
- 20: para obtener el total de unidades en los 20 μ que se cargan en la preparación de la muestra (ver anexo II).
- 10: cantidad de μ con los que se obtiene el mejor patrón de bandeo.
- 110: total de μ preparados en la preparación de la muestra (ver anexo II).
- 0.217: promedio de UI.

Al utilizar la formula se asegura que en todos los casos se carguen en promedio 2.17 UI/ml de FvW.

7.8.2.3 Corrimiento.

Se inicia el corrimiento a 10 mA por gel (aproximadamente 22 mA, 40-50 Volts), hasta que el frente de corrimiento llegue al final del gel, el tiempo aproximado puede ser desde 6-18 horas.

7.8.2.4 Transferencia en semi-seco.

Se realiza electrotransferencia en semi-seco a membranas de PVDF (Polifluoruro de Vinilideno) pre tratadas con metanol, en un equipo (Ver anexo I) se arma un sándwich colocando en el siguiente orden: papel filtro, PVDF, gel, Papel filtro, todo esto humedecido con buffer de transferencia (Ver anexo III) y se aplica una corriente constante de 300 mA (equivalente a 18 V) durante una hora.

7.8.2.5 Bloqueo de sitios inespecíficos.

Se bloquean los sitios inespecíficos de la membrana con una solución de TBS-T 0.15M – Albumina (Ver anexo III) durante 30 minutos en agitación constante.

7.8.2.6 Inmunolocalización.

Se utilizan anticuerpos que permiten la detección selectiva del componente de interés. La permeabilidad de los geles para el acceso del anticuerpo es limitada, por lo que se hace una transferencia de las moléculas separadas en el gel hacia una membrana de PVDF, la cual se somete luego a la disolución que contiene el anticuerpo. El anticuerpo primario se une y marca la proteína de interés. El anticuerpo secundario determina si el anticuerpo primario se unió a la proteína de interés.

Se incuba con el anticuerpo primario (Ver anexo I) en proporción 1:2000, (Ver anexo III) durante toda la noche en agitación constante. Se realizan 4 lavados con TBS-T 0.15M (Ver anexo III) con cantidad suficiente para que se tape la membrana durante 5 minutos cada uno. Se incuba con el anticuerpo secundario (Ver anexo I) a proporción 1:4000, (Ver anexo III) durante una hora en agitación constante. Se Realizan 4 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T 0.15M en cantidad suficiente para cubrir la membrana.

7.8.2.7 Revelado.

El revelado se realiza utilizando un sustrato cromógeno (luminol) y peróxido de hidrogeno. Se cubre la membrana en luminol (Ver anexo I) hasta observar reacción quimioluminiscente (unos segundos), se coloca la membrana en un Cassete de revelado (Ver anexo I) y se expone una placa especial de revelado (Ver anexo I) en diferentes tiempos (15seg, 1min, 3min, etc.), después de la exposición, las placas obtenidas se colocan en las siguientes soluciones en este orden: solución reveladora (aproximadamente 50 segundos cuando se comienzan a visualizar los patrones de bandeo), enjuagar en agua, solución fijadora (30 segundos), se limpian y se dejan secar.

Como resultado, obtenemos un patrón de bandeo, en el cual, aparecen bandas en la parte superior, que corresponden a multímeros de alto peso molecular (APM), bandas de peso molecular intermedio (PMI) y multímeros de bajo peso molecular (BPM) (Hernández et al., 2014).

Posteriormente este patrón de bandas obtenido se analiza por densitometría mediante el programa ImageJ 1.50b.

8. Resultados.

8.1 Características clínicas y demográficas.

Incluimos en este estudio un total de 50 participantes, 30 pacientes con Artritis Reumatoide (AR) y 20 voluntarios sanos pareados por edad y género. El 95.0% del total de pacientes con AR pertenecieron al género femenino y 5% al género masculino. La edad promedio del grupo con AR fue de 49.7 años con una desviación estándar de ± 11.29 , con una mínima de 29 años y una máxima de 66 años. La edad promedio del grupo control de 46.7 años con una desviación estándar de ± 10.93 con una mínima de 26 años y máxima de 62 años (Tabla 3).

Grupo		N	Media	Desviación tip.	P
Edad	Control	20	46.7000	10.93088	0.112
	Artritis	30	49.7000	11.29281	
IMC	Control	20	22.1830	2.07752	0.060
	Artritis	30	24.5296	3.10715	
VPM	Control	17	7.9529	1.25256	0.003
	Artritis	23	9.7904	1.50741	
Plaquetas	Control	15	275133	63816.55256	0.033
	Artritis	22	315363	64144.58776	
HB	Control	15	14.1147	1.29464	0.040
	Artritis	18	13.1111	1.36980	
GB	Control	15	6.3533	1.56016	0.635
	Artritis	17	6.7165	2.53684	
HTO	Control	15	40.5133	3.77981	0.492
	Artritis	12	39.5583	3.20836	
Glucosa	Control	15	82.1333	6.69613	0.160
	Artritis	15	89.2667	9.97473	
Colesterol	Control	15	199.2667	34.38743	0.410
	Artritis	13	187.6923	38.82951	
Triglicéridos	Control	15	140.3333	75.61148	0.341
	Artritis	13	118.1538	35.05198	

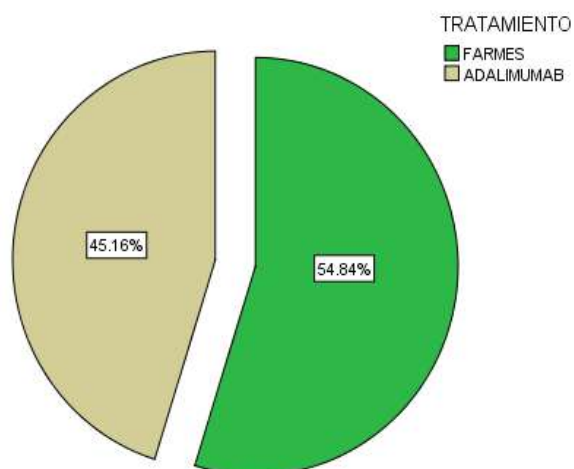
Tabla 3: características clínicas y demográficas de los grupos de estudio Artritis reumatoide vs grupo control.

Clasificamos a los pacientes con artritis reumatoide (n=30) de acuerdo al tratamiento que estaban recibiendo (Tabla 4).

Tratamiento		N	Media	Desviación tip.	P
Edad	FARMES	16	50.8750	10.66380	0.55
	BIOLOGICO	14	48.3571	12.23241	
IMC	FARMES	16	24.9653	3.53674	0.42
	BIOLOGICO	14	24.0317	2.56966	
Das 28	FARMES	16	4.0737	0.95812	0.92
	BIOLOGICO	14	4.1121	1.20947	
Tiempo evolución	FARMES	16	12.2813	9.81830	0.57
	BIOLOGICO	14	10.5714	6.02194	
HB	FARMES	8	12.4875	1.05619	0.08
	BIOLOGICO	10	13.6100	1.43329	
HTO	FARMES	5	38.1400	3.44572	0.20
	BIOLOGICO	7	40.5714	2.84295	
GB	FARMES	8	5.8562	1.27665	0.19
	BIOLOGICO	9	7.4811	3.16974	
VPM	FARMES	12	10.1667	1.30268	0.21
	BIOLOGICO	11	9.3800	1.66649	
Plaquetas	FARMES	11	315363	61947	0.94
	BIOLOGICO	11	325862	69304	
VSG	FARMES	16	27.8125	12.25952	0.47
	BIOLOGICO	14	24.2143	14.92122	
PCR	FARMES	16	20.1563	14.50310	0.91
	BIOLOGICO	14	19.4714	21.43539	
Glucosa	FARMES	8	88.1250	8.77395	0.65
	BIOLOGICO	7	90.5714	11.77366	
Colesterol	FARMES	5	170.4000	32.98939	0.21
	BIOLOGICO	8	198.5000	40.19595	
Triglicéridos	FARMES	5	101.6000	23.39444	0.18
	BIOLOGICO	8	128.5000	38.41131	

Tabla 4: Características clínicas y demográficas del grupo AR de acuerdo al tratamiento (convencional / biológico).

El 45.16% de los pacientes con artritis reumatoide se encontraban bajo tratamiento con terapia biológica y el 58.84% con fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad.



A pesar de encontrarse bajo tratamiento, en estos pacientes continúa la constante actividad de citoquinas inflamatorias (IL1, IL6, TNF α) y por lo tanto, la elevación de las reactantes de fase aguda (**Figura 17**):

Correlaciones			VSG	PCR
Rho de Spearman	VSG	Coefficiente de correlación	1.000	.389*
		Sig. (bilateral)	.	.031
		N	31	31
	PCR	Coefficiente de correlación	.389*	1.000
		Sig. (bilateral)	.031	.
		N	31	31

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

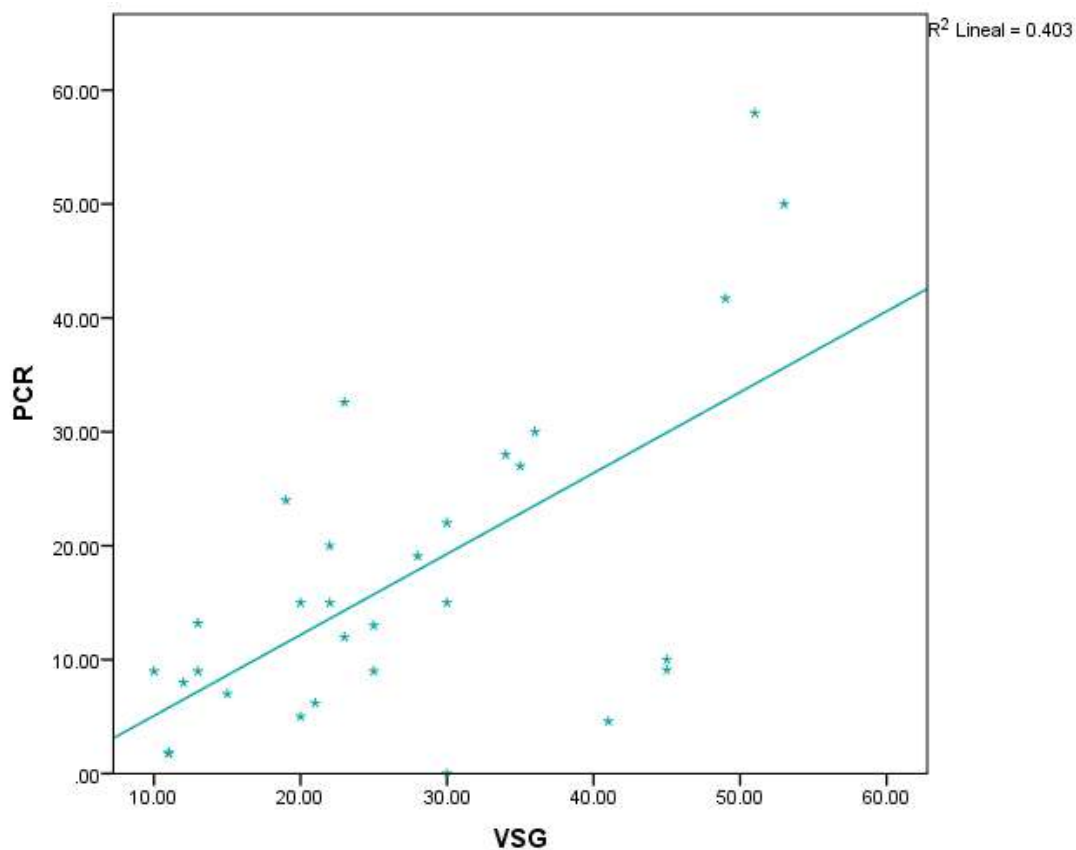


Figura 17: Correlación positiva entre biomarcadores liberados en la fase aguda del proceso inflamatorio.

8.2 Estudio molecular del Factor de von Willebrand.

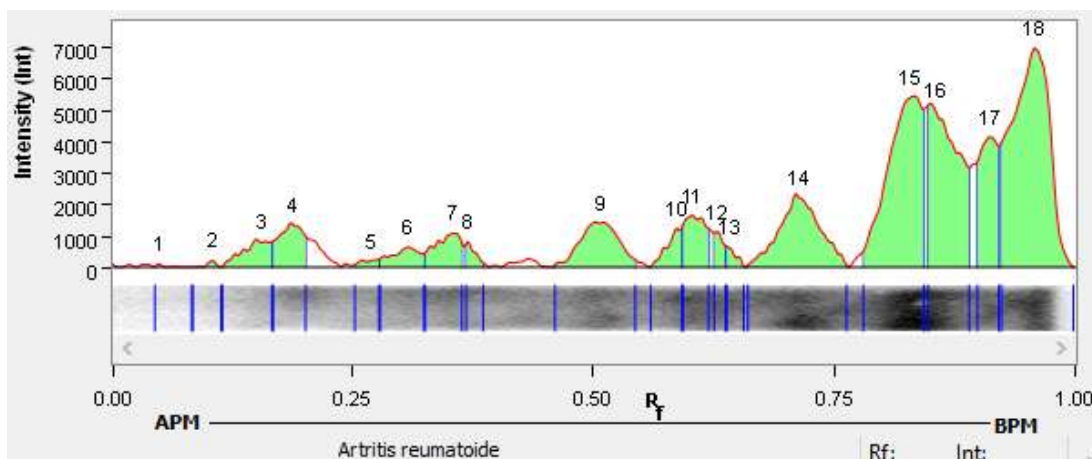
Estudiamos la estructura molecular del Factor de von Willebrand por medio de muestras plasmáticas no desnaturalizadas (reducidas) mediante inmunoelectrotransferencia en geles de agarosa, técnica que permite obtener el característico patrón de bandeo de esta proteína multimérica. Realizamos electroforesis discontinua en geles de agarosa 1.8-1% manipulando cada muestra de acuerdo a la concentración plasmática del FvW obtenida mediante ELISA, trabajando en cada caso con el equivalente a 2.17 UI/ml de FvW (Figura 18).



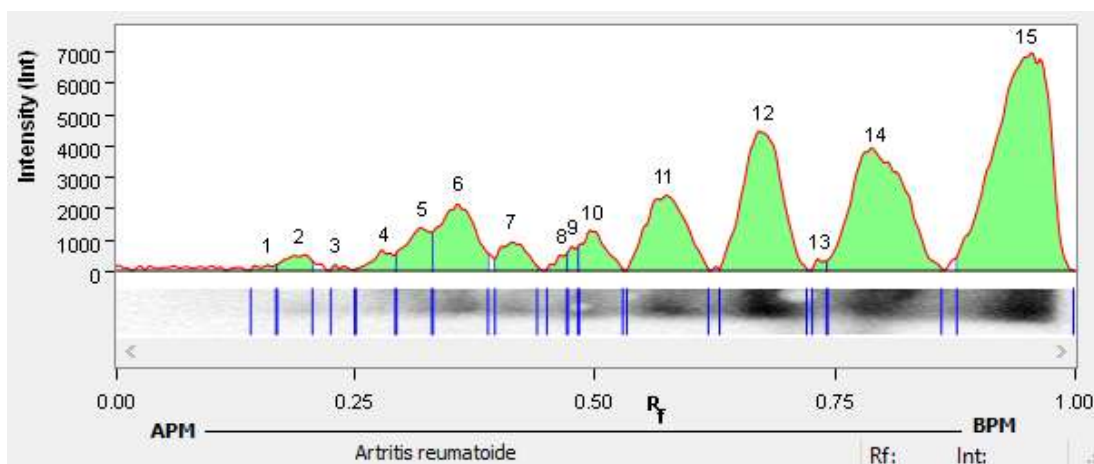
Figura 18: Comparación de la estructura multimérica del FvW en un control sano en el cual se observa un patrón de bandeo uniforme (izquierda) y en un paciente con artritis reumatoide cuya estructura presenta un predominio de multímeros de alto peso molecular (APM) (derecha).

Figura 19: Comparación de densitogramas que muestran la presencia de multímeros de alto peso molecular (APM) en los patrones de bandeo de los pacientes con artritis reumatoide en comparación con un control.

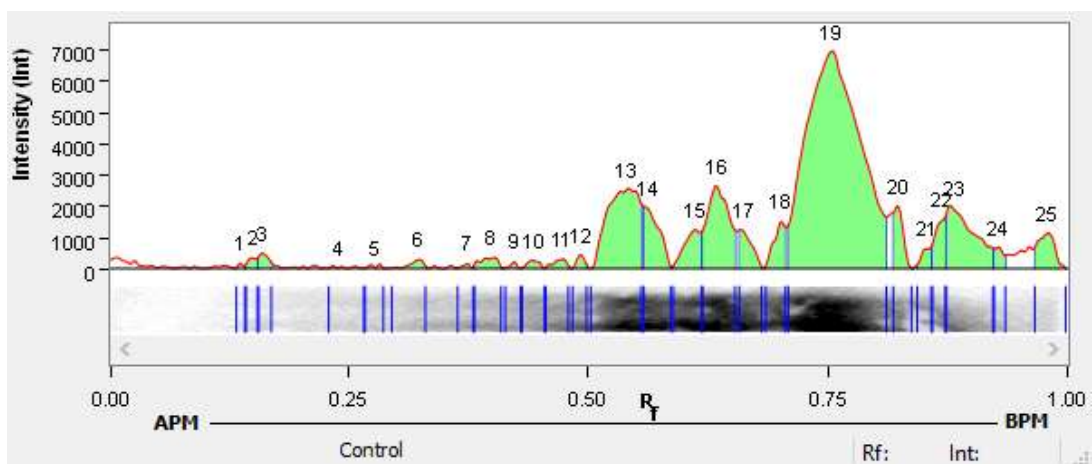
1.



2.



3.



Comparamos la estructura molecular del FvW (Figura 22) entre grupos y realizamos un análisis densitométrico individual, observamos diferencias en el comportamiento del patrón de bandeado, los resultados se muestran a continuación:

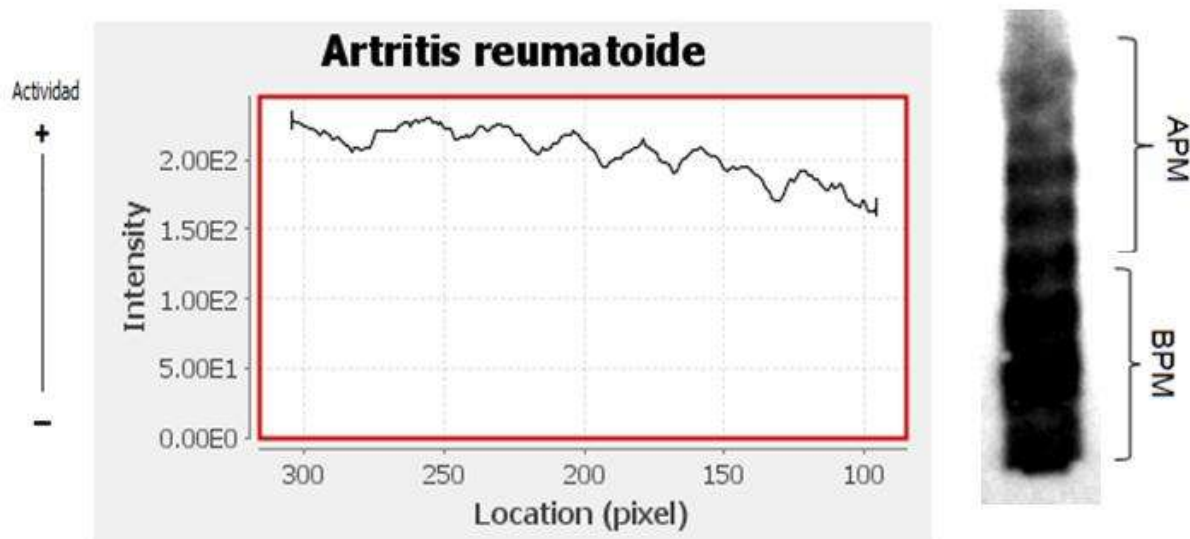


Figura 20: Densitograma de la estructura molecular del FvW obtenido de un paciente con artritis reumatoide que muestra mayor densidad (intensidad) en los multímeros de alto peso molecular en comparación con los de bajo peso.

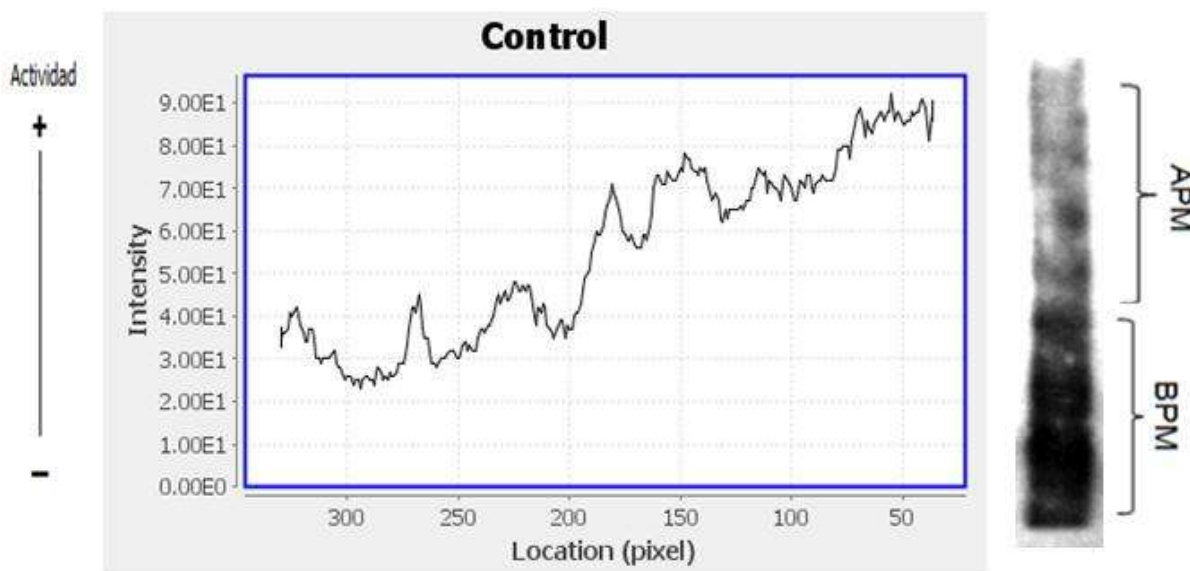


Figura 21: Densitograma de la estructura molecular del FvW obtenido de un control sano que muestra una mayor densidad (intensidad) en los multímeros de bajo peso molecular.



Figura 22: Imagen demostrativa de la presencia del multímeros de alto peso molecular en la estructura del FvW en un paciente con artritis reumatoide (izquierda) en comparación con un control (derecha).



Figura 23: Diferencia en la estructura molecular del FvW en un paciente con AR con tratamiento biológico (izquierda) y con tratamiento convencional (derecha), ambos con presencia de multímeros de alto peso molecular.

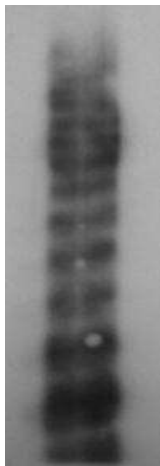
Estructura multimérica del Factor de von Willebrand			
			
AR	AR	AR	C

Tabla 5: Comparativo de patrones de bandeo de la estructura del FvW donde los multímeros de alto peso molecular son los más hemostáticamente efectivos entre pacientes con artritis reumatoide sin factores de riesgo cardiovascular y grupo sano.

8.3 Análisis densitométrico.

Comparamos la media obtenida por densitometría de los patrones de bandeo de la estructura del FvW entre los grupos AR (86.8 ± 36.5) vs grupo control (65.2 ± 15.5) mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

Estadísticos de contraste ^a	
	MEDIA
U de Mann-Whitney	170.000
W de Wilcoxon	360.000
Z	-2.488
Sig. asintót. (bilateral)	.013

a. Variable de agrupación: GRUPO

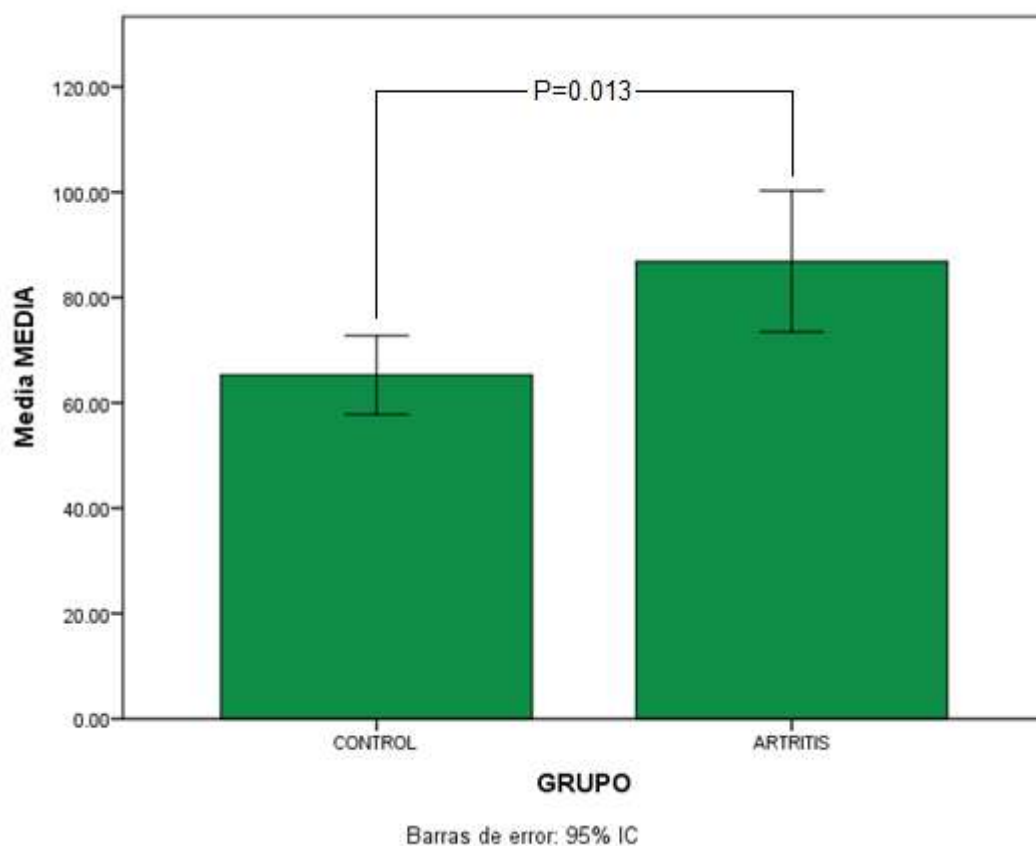


Figura 24: Grafica comparativa del análisis densitométrico de los patrones de bandeo del FvW, observamos una mayor densidad en la estructura multimérica de los pacientes con artritis reumatoide en comparación con el grupo control.

Comparamos la concentración del FvW obtenida de las muestras plasmáticas de pacientes AR (126.1 ± 33.6) y controles C (110.6 ± 21.2) $P=0.077$ (Figura 25).

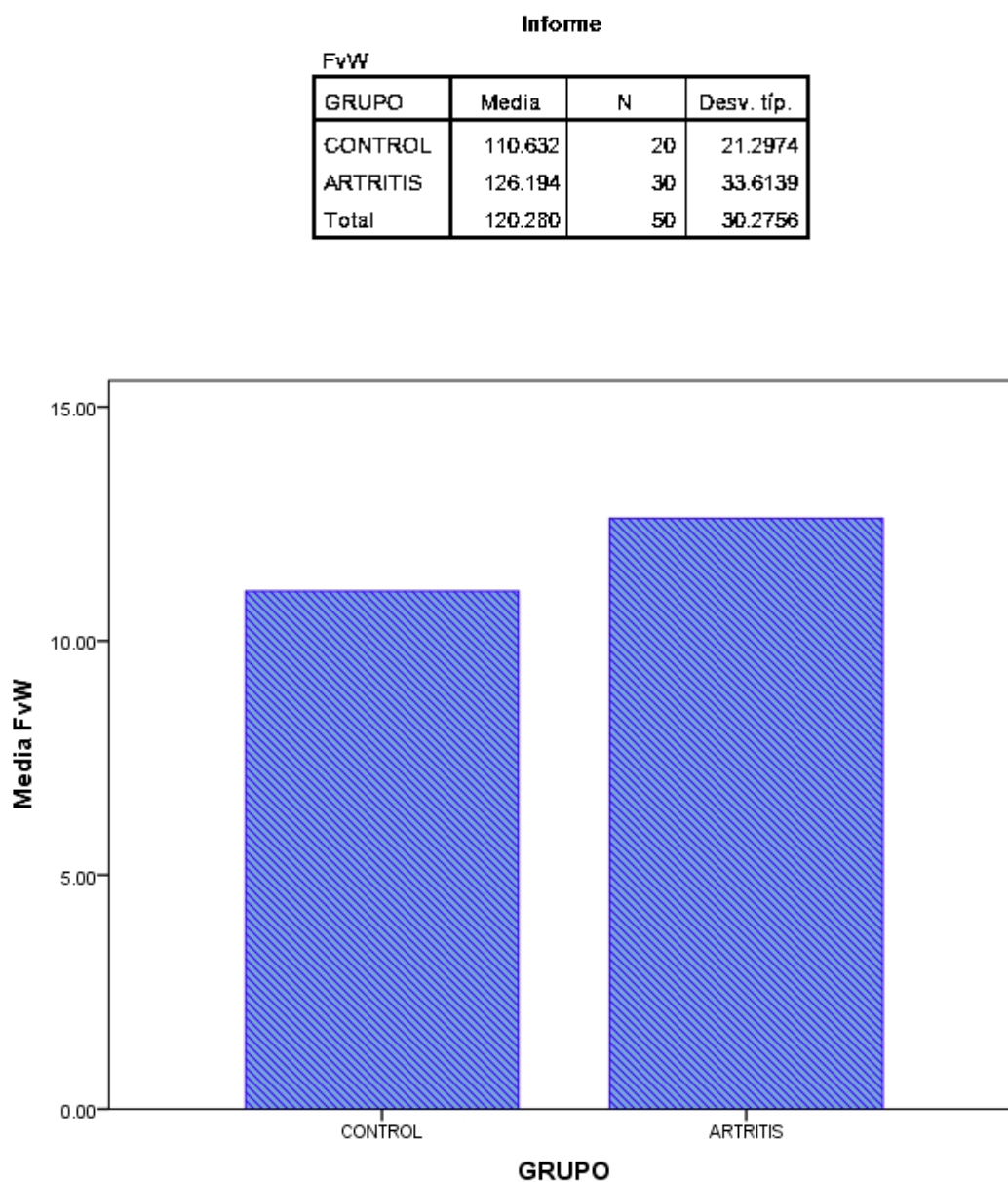


Figura 25: Grafico comparativo de la concentración plasmática del FvW, observamos niveles ligeramente más elevados del FvW en los pacientes con artritis reumatoide en comparación con el grupo control.

Utilizamos el coeficiente de correlación de Spearman para determinar la asociación de la concentración plasmática del FvW con biomarcadores de activación plaquetaria (P-selectina), inflamación (IL6, TNF α) y actividad de la enfermedad reumatológica (DAS28) (Figura 26).

Correlaciones			FvW	DAS28	TNF α	IL6	Pselectina
Rho de Spearman	FvW	Coeficiente de correlación	1.000	.242	.400	.139	.224
		Sig. (bilateral)	.	.191	.026	.455	.225
		N	31	31	31	31	31

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

**. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

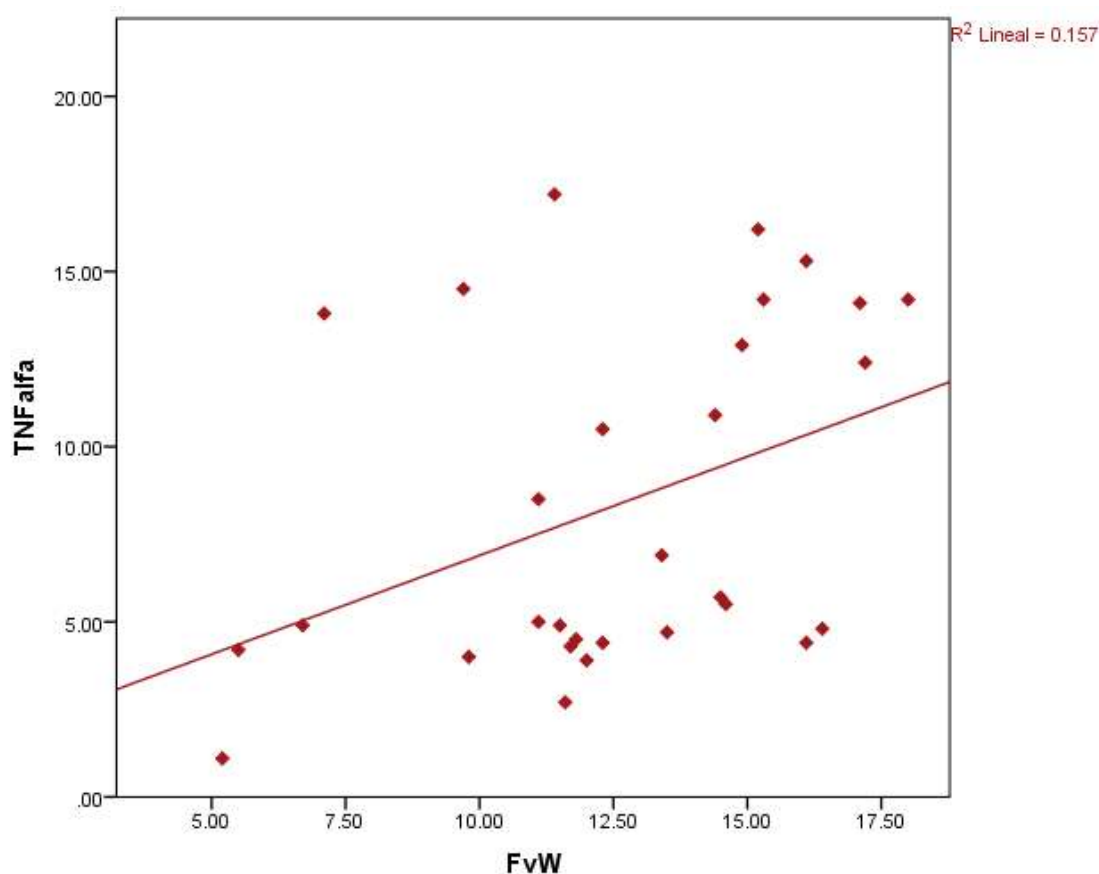


Figura 26: Gráfico de dispersión que muestra una correlación positiva entre la concentración del FvW y la citocina proinflamatoria TNF α .

Realizamos la comparación de las medias obtenidas del análisis densitométrico y de la concentración plasmática del FvW de acuerdo a la actividad de la enfermedad articular determinado por DAS28:

Informe

RANGODAS28		DenFvW	FvW100
ACTIVIDAD BAJA	Media	71.5897	131.0000
	N	6	6
	Desv. típ.	22.44812	28.54470
ACTIVIDAD MODERADA	Media	94.2876	118.2222
	N	18	18
	Desv. típ.	44.17300	36.23868
ACTIVIDAD ALTA	Media	80.8421	142.5714
	N	7	7
	Desv. típ.	16.75691	26.88777
Total	Media	86.8584	126.1935
	N	31	31
	Desv. típ.	36.52457	33.61391

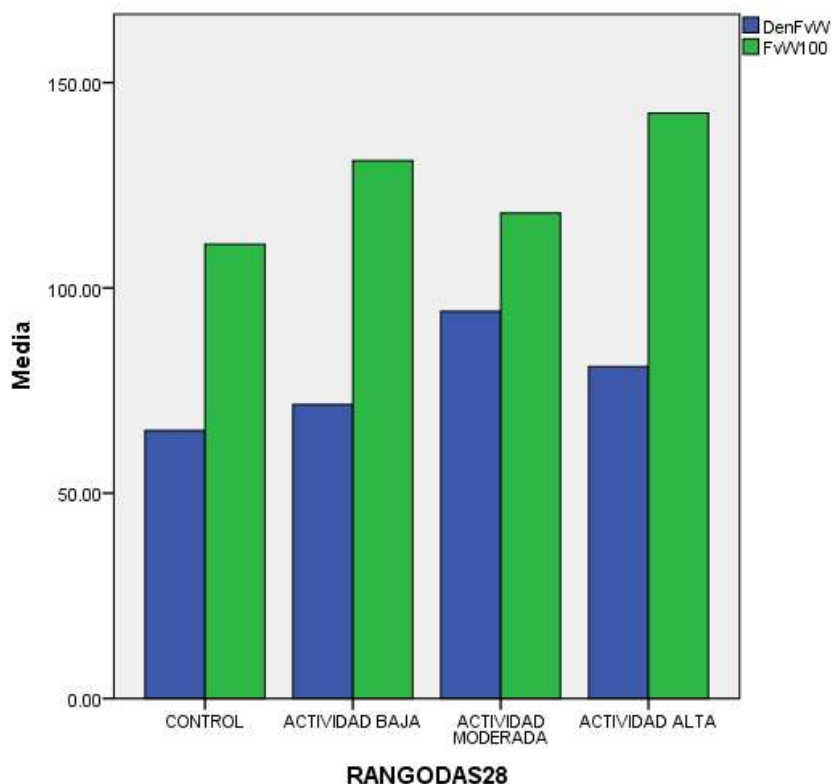


Figura 27: Grafico comparativo de la concentración y la densidad de la estructura molecular del FvW de acuerdo a la actividad de la enfermedad.

Comparamos la concentración del FvW de los pacientes con artritis reumatoide de acuerdo al tratamiento bajo el que se encontraban, tratamiento convencional (116.1 ± 38.64) o terapia biológica (138.3 ± 21.8) $P=0.06$.

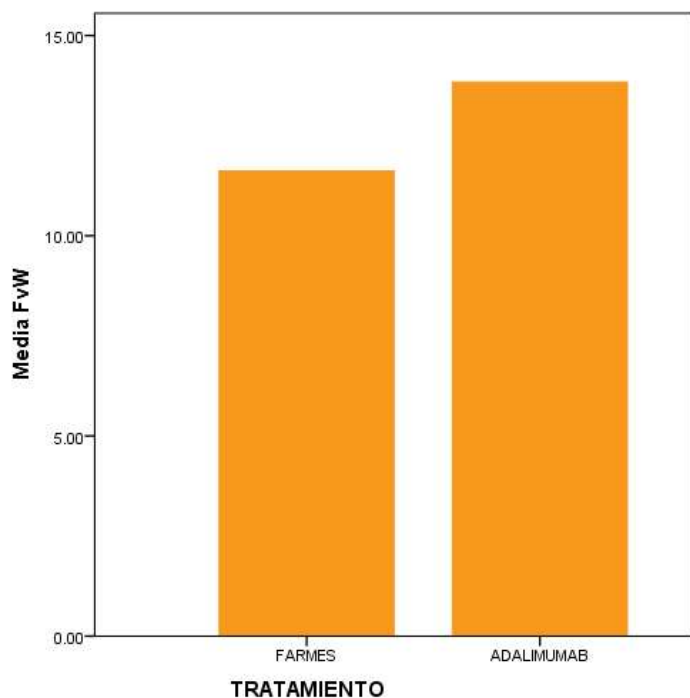


Figura 28: Grafica comparativa de la concentración del FvW de acuerdo al tratamiento bajo el que se encontraban los pacientes con artritis reumatoide, observamos una concentración más alta del FvW en los pacientes que se encontraban con terapia Anti-TNF α en comparación con los que se encontraban con fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad.

Encontramos una correlación positiva de la concentración del FvW con el factor reumatoide.

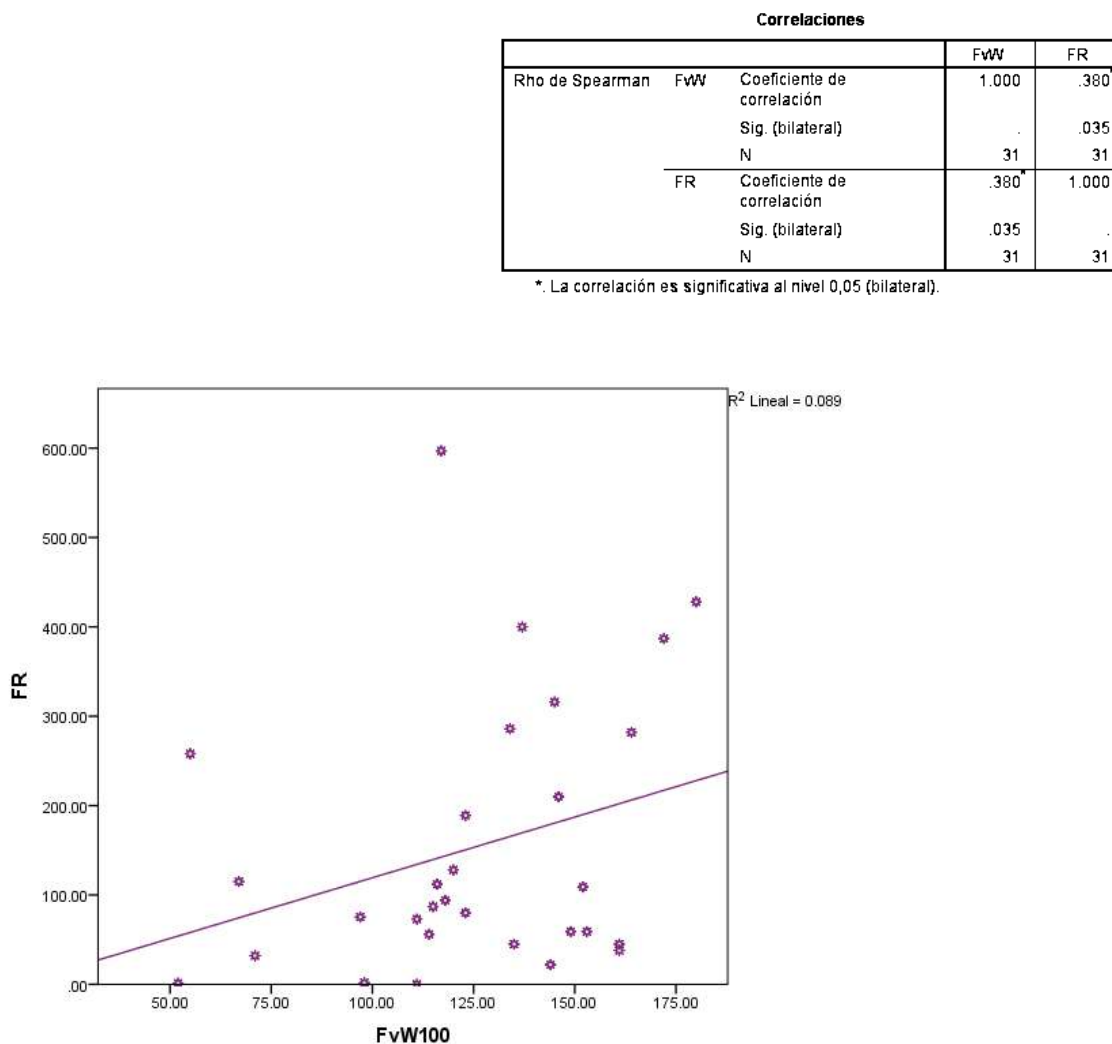


Figura 29: Grafico de dispersión que muestra una correlación positiva de la concentración del FvW con el factor reumatoide.

9. Discusión.

Participaron en este estudio dos grupos pareados por edad y género: 30 pacientes con artritis reumatoide sin factores de riesgo cardiovascular tradicionales, en un estado activo de la enfermedad mayor a dos años de evolución y 20 voluntarios sanos, encontramos diferencia estadística entre ambos grupos en las plaquetas, el volumen plaquetario medio y los eritrocitos (HB), las características clínicas y demográficas de los pacientes con artritis reumatoide fueron comparadas también de acuerdo al tratamiento y no se obtuvieron diferencias estadísticas lo que indica que ambos grupos son homogéneos.

Se han reportado concentraciones plasmáticas elevadas del Factor de von Willebrand en padecimientos autoinmunes y afecciones cardíacas, sin embargo, en comparación con otros estudios realizados en artritis reumatoide (McIntegart et al., 2001)(Seriolo, Accardo, & Cutolo, 1994)(Fenling et al., 2014), la concentración plasmática del FvW no resultó significativa al comparar los pacientes con AR vs Grupo control, lo cual, podría justificarse debido a que el presente estudio se llevó bajo un control muy estricto en los criterios de inclusión y de acuerdo a ellos, los pacientes estuvieron exento de factores de riesgo cardiovascular tradicionales, los cuales ejercen cierta influencia en los niveles plasmáticos del FvW.

Además, los pacientes incluidos en este estudio se encontraban ya bajo tratamiento, ya fuera convencional (FARMES) o biológico. Se ha sugerido la reducción del riesgo cardiovascular tanto por el uso de FARMES, especialmente metotrexato (Palaskas, Lakkis, & Tabbaa, 2013) como de la terapia anti-TNF α (Nurmohamed et al., 2015)(Groot et al., 2015) y existe la observación de que el éxito del tratamiento y la reducción consecutiva de los factores de riesgo disminuyen los niveles de FvW (Paulinska, Spiel, & Jilma, 2009). Realizamos una comparación de las medias obtenidas de la concentración del FvW de acuerdo al tratamiento y encontramos la concentración ligeramente más elevada en los pacientes con terapia anti-TNF α en comparación con los que se encontraban bajo tratamiento convencional.

A pesar de los significativos avances que ha habido en el tratamiento de los trastornos reumatológicos con la disponibilidad de nuevos fármacos modificadores de la enfermedad y agentes biológicos, la enfermedad cardiovascular (ECV) sigue siendo significativamente mayor en estos pacientes.

El TNF α es la citoquina proinflamatoria por excelencia dentro de la artritis reumatoide y encontramos una correlación positiva del FvW con esta citocina lo que indica la relación directa de la inflamación con la disfunción endotelial en estos pacientes, es de suponerse que en AR, la disfunción / activación endotelial refleja el aumento del nivel de FvW y por lo tanto, un cambio hacia la actividad protrombótico del endotelio (Gurol et al., 2015). Independientemente de la concentración, la función biológica del FvW

depende en gran medida del tamaño de sus multímeros, multímeros de alto peso molecular (MAPM) fueron encontrados en varios de estos pacientes y hasta el momento, no se cuenta con ningún estudio que haya visualizado la estructura del FvW en una patología inflamatoria, los MAPM han sido encontrados en afecciones cardiovasculares, las cuales, son muy comunes dentro de eventos inflamatorios agudos o crónicos como la Artritis reumatoide, sin embargo, de manera importante hay que resaltar que estos pacientes estaban exentos de factores de riesgo cardiovascular, lo cual nos muestra que los MAPM no son exclusivos de la enfermedad cardiovascular desarrollada sino que pueden ser predisponentes de riesgo en un medio donde la inflamación y la disfunción endotelial desempeñan un papel fundamental en la iniciación, progresión y propagación del proceso aterosclerótico (Jean-baptiste, 2003). En consecuencia, la aterosclerosis podría ser el resultado de la respuesta inflamatoria crónica de la pared arterial en relación con factores de riesgo vascular, que condicionan una alteración del proceso de renovación/reparación de la pared vascular. La inflamación promueve, no sólo el inicio de la lesión, sino también la progresión y desarrollo de complicaciones aterotrombóticas responsables de diversos cuadros clínicos (Páramo, Rodríguez, & Orbe, 2007).

En nuestro estudio encontramos una mayor densidad en los patrones de bandeo de la estructura multimérica del FvW de los pacientes con AR en comparación con el grupo control, una mayor densidad sugiere una mayor cantidad de multímeros en cada banda y por lo tanto una mayor funcionalidad.

Realizamos un análisis del comportamiento de la concentración y la estructura molecular del FvW de acuerdo a los estadios de la actividad reumatológica y encontramos diferencias principalmente en el estadio moderado donde la densidad de la estructura incrementa y la concentración disminuye, esta proteína tiene un comportamiento independiente funcionalidad/concentración como se ha descrito en Enfermedad de von Willebrand, pero no se ha estudiado fuera de ella.

El FvW tiene funciones bien definidas dentro de la hemostasia, pero al ser una proteína multimérica con diversos sitios de unión, ¿Tiene la capacidad de adoptar otras funciones? en el presente trabajo estudiamos la estructura del FvW en artritis reumatoide ya que esta enfermedad confiere el estado inflamatorio y este factor cuenta en su dominio C1 con una secuencia RGD capaz de reconocer glicoproteínas con una secuencia similar y unirse a ellas, tal como las que se encuentran presentes en la superficie de células endoteliales (CE). Un estudio realizado en el laboratorio de hemostasia y biología vascular encontró en pacientes con AR abundantes células endoteliales circulantes en su estadio maduro (N. García, Viveros, Gutierrez, Álvarez, & Areán, 2016), la presencia de estas células indica el desprendimiento de la capa íntima endotelial dañada y se reportan números altos en estados de enfermedad que aceleran el proceso vascular-patológico tales como la enfermedad cardiovascular,

donde se ha encontrado que los niveles de la CECs (células endoteliales circulantes) se correlacionan con los niveles de FvW (Foster, Shantsila, Carruthers, Lip, & Blann, 2009), las células endoteliales son anclaje-dependientes, el cual, al perderse desencadena muerte por anoikis ya que la adhesión celular a las glicoproteínas estructurales de la matriz extracelular es necesaria para la supervivencia de todas las células, entre otras, las diferenciadas en el sistema cardiovascular, incluyendo células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos y miocitos cardíacos, a su vez, este tipo de apoptosis celular está involucrada en la remodelación patológica de los tejidos cardiovasculares, incluyendo desendotelización y ruptura de la placa en aterosclerosis, fundamentado en que, al haber un exceso de anoikis por el intento de remodelación, hay también una degeneración del tejido, por lo tanto, el exceso es probablemente el caso en las patologías degenerativas cardiovasculares (Jean-baptiste, 2003), entonces, por un lado tenemos la disfunción endotelial presente en la inflamación de los pacientes con AR incrementa la liberación del factor von Willebrand y por otro, el aumento en la apoptosis del tejido sinovial dañado. Aunque no está claro que mecanismos están implicados en la generación de CECs, se considera posible la acción de las citoquinas inflamatorias en exceso, tal como el factor de necrosis tumoral (Foster et al., 2009), también el FvW puede ser liberado por las células endoteliales por citoquinas inflamatorias (Paulinska et al., 2009).

Hay indicios de que el FvW puede participar activamente en la respuesta inflamatoria, funcionando como una superficie adhesiva para leucocitos a través de interacciones con el ligando - 1 GP P- selectina e integrinas B2 (Lenting, Casari, Christophe, 2012), los neutrófilos son los leucocitos circulantes predominantes reclutados por el endotelio activado en la aterosclerosis experimental, estos pueden liberar proteasas (elastasa y catepsina G) capaces de degradar glicoproteínas celulares adhesivas, lo cual desencadena en anoikis, proceso implicado tanto en la fisiopatología del desprendimiento de las células en los tejidos cardiovasculares y la ausencia de curación celular de los tejidos lesionados proteolíticamente (Jean-baptiste, 2003)(Chiarugi & Giannoni, 2008).

10. Conclusiones.

Los pacientes con Artritis Reumatoide sin riesgo cardiovascular aparente, a pesar de presentar concentraciones plasmáticas normales del factor de von Willebrand, sin embargo, presentan una estructura molecular alterada del mismo, con presencia de multímeros de elevado peso molecular, lo cual los coloca en riesgo protrombótico y cardiovascular. Los multímeros de elevado peso molecular del FvW pudieran estar relacionados con los procesos de aterosclerosis acelerada observados en estos pacientes.

El Factor de von Willebrand es una proteína multifuncional de comportamiento independiente funcionalidad/concentración involucrada en diversas patologías dentro y fuera de la hemostasia, de mecanismos bien definidos y otros tantos no tan estudiados, esta investigación estuvo dirigida a lograr una mejor comprensión de cómo se regula el FvW en condiciones de enfermedad inflamatoria.

11. Bibliografía.

- Acon, D., Zapata, N., & Méndez, A. (2012). Artritis reumatoide. *Revista Medica de Costa Rica Y Centroamerica LXIX*, (602), 299–307.
- Badimón, L., & Martinez, J. (2006). Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol Supl*, 6, 21A–30A.
- Batlle, J. (1993). Patología molecular del factor Von Willebrand. *Universidad de Santiago de Compostela*, 37–56.
- Cardiel, M. H., Díaz-borjón, A., Vázquez, M., Gámez-nava, J. I., Barile, L. A., Pacheco, C., ... Espinosa, R. (2014). Actualización de la Guía Mexicana para el Tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología. *Reumatol Clin*, 10(4), 227–240.
- Chiarugi, P., & Giannoni, E. (2008). Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology*, 76, 1352–1364. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.023>
- Duró, J. (2010). *Reumatología Clínica*.
- Espitia, F. (2010). Manejo de la enfermedad de von Willebrand en ginecología y obstetricia. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, 61(2), 151–159.
- Espondaburu, O. R., Alicia, V., Hunt, F., & Ocampo, L. I. (2004). El proceso aterogénico y su desarrollo en las enfermedades autoinmunes. *Acta Bioquím Clin Latinoam*, 38(2), 181–192.
- Fanelli, R., Schembri, L., Piarulli, U., Pinoli, M., Rasini, E., Paolillo, M., ... Marino, F. (2014). Effects of a novel cyclic RGD peptidomimetic on cell proliferation, migration and angiogenic activity in human endothelial cells. *Vascular Cell*, 6(11), 1–9.
- Fenling, F., Galvin, A., Fang, L., Andrew, D., Moore, X., Sparrow, M., ... Dart, A. (2014). Comparison of inflammation , arterial stiffness and traditional cardiovascular risk factors between rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. *Journal of Inflammation*, 11(29), 1–9. <http://doi.org/10.1186/s12950-014-0029-0>
- Foster, W., Shantsila, E., Carruthers, D., Lip, G. Y. H., & Blann, A. D. (2009). Circulating endothelial cells and rheumatoid arthritis : relationship with plasma markers of endothelial damage / dysfunction. *Rheumatology*, 48, 285–288. <http://doi.org/10.1093/rheumatology/ken486>
- Frisch, S., & Screaton, R. (2001). Anoikis mechanisms. *Cell Biology*, 13, 555–562.
- García, N., Viveros, M., Gutierrez, S., Álvarez, M. A., & Areán, C. (2016). Células progenitoras endoteliales: correlación con actividad de la enfermedad y biomarcadores de inflamación. *Reumatol Clin*, 12(1), S020.

- García, V. (2004). El equilibrio hemostático, un proceso complejo y dinámico. *Haematologica*, 89, 87–96.
- Gil, Páramo, & García. (2003). Hemostasia , angiogénesis y cáncer : papel del factor von Willebrand. *Rev Clin Esp*, 203(4), 199–201.
- Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1473–1477. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401723>
- González, M. F., Gil, J. G., Sandoval, A. A., Javier, F., García, B., Sueiro, L. F., ... Coruña, S.-A. (2004). Artritis reumatoide. *Guías Clínicas*, 4(39), 1–6.
- Groot, L., Jager, N., Westra, J., Smit, A., Kallenberg, C., Posthumus, M., & Bijl, M. (2015). Does reduction of disease activity improve early markers of cardiovascular disease in newly diagnosed rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology*, 54, 1257–1261. <http://doi.org/10.1093/rheumatology/keu459>
- Gurol, G., Ciftci, I. H., Harman, H., Karakece, E., Kamanli, A., & Tekeoglu, I. (2015). Roles of claudin-5 and von Willebrand factor in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(2), 1979–1984.
- Haberichter, S. (2015). Perspectives von Willebrand factor propeptide : biology and clinical utility. *Blood*, 126(15), 1753–1762. <http://doi.org/10.1182/blood-2015-04-512731>.
- Hernández, E., Zavala, C., Viveros, M., Ochoa, A., Martínez, C., & Reyes, E. (2014). Determinación de los multímeros del factor von Willebrand en población mexicana. *Cir Cir*, 82, 607–618.
- Jean-baptiste, M. (2003). Anoikis in the cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 2146–2155. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000099882.52647.E4>
- Ledford-kraemer, M. R. (2010). Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *American Journal of Hematology*, 85(April), 510–514. <http://doi.org/10.1002/ajh.21739>
- Lenting, Casari, Christophe, D. (2012). von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost*, 10, 2428–2437. <http://doi.org/10.1111/jth.12008>
- Li, S., Wang, Z., & Liao, Y. (2009). The glycoprotein Iba – von Willebrand factor interaction induces platelet apoptosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8, 341–350. <http://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03653.x>
- Lillicrap, D. (2008). Ciencia básica, diagnóstico y tratamiento médico de la enfermedad de Von Willebrand. *Federacion Mundial de La Hemofilia*, (35).
- Lillicrap, D., & James, P. (2009). ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND : INTRODUCCIÓN PARA MÉDICOS DE ATENCIÓN PRIMARIA. *Federación Mundial de La Hemofilia*, (47).

- Lizarbe, A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.*, 101(2), 1–33.
- López, S., Godínez, D., Gutiérrez, S., Areán, C., & Viveros, M. (2013). Análisis de la estructura multimérica del Factor von Willebrand mediante electroforesis vertical en geles de agarosa-SDS y transferencia semi-seco. *Revista de Hematología*, 14, s9.
- Martínez, C., & Quintana, S. (2008). *Hemostasia y trombosis*.
- Martínez, Berges, García, Hernández, Murillo, Q. (2010). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de von Willebrand. *Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica IMSS*.
- Mcentegart, A., Capell, H. A., Creran, D., Rumley, A., Woodward, M., & Lowe, G. D. O. (2001). Cardiovascular risk factors , including thrombotic variables , in a population with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 40(i), 640–644.
- McInnes, I., & Schett, G. (2007). MCLNNE SCHETT. *Nature Reviews Immunology*, 7(6), 429–442.
- Muñoz, G., Viveros, M., Areán, C., Vega, E., López, S., & Gómez, A. (2015). Von Willebrand Factor Plasma Levels Variability In Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Journal of Atrial Fibrillation*, 7(4), 99–105.
- Nurmohamed, M. T., Heslinga, M., & Kitas, G. D. (2015). Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, 11(12), 693–704. <http://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.112>
- Oliva, E., Martínez, M. P., Zapata, M., & Sánchez, S. H. (2012). Artritis Reumatoide : prevalencia, inmunopatogenia y antígenos relevantes para su diagnóstico. *Archivos de Medicina*, 8(13), 1–7. <http://doi.org/10.3823/084>
- Ortiz, L., Arévalo, M. A., & Rosales, D. M. (2010). ARTRITIS REUMATOIDE : ALGUNOS ASPECTOS INMUNOLÓGICOS. *Revista Médica de La Extension Portuguesa*, 4(2), 41–56.
- Palaskas, N., Lakkis, N., & Tabbaa, R. (2013). Atherosclerosis and Other Cardiovascular Manifestations of Rheumatologic Diseases. *Rheumatol Curr Res*, 5s. <http://doi.org/10.4172/2161-1149.S5-00>
- Palomo, Ferreira, Sepúlveda, Roseblatt, V. (2009). *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica*.
- Páramo, J., Rodríguez, J., & Orbe, J. (2007). Aterosclerosis en las enfermedades inflamatorias. *Med Clin*, 128(19), 749–756.
- Paulinska, P., Spiel, A., & Jilma, B. (2009). Role of von Willebrand factor in vascular disease. *Hämostaseologie*, 1, 32–38.

- Ping, L., Ni, B., & Yang, X. (2012). von Willebrand Factor : More Than a Regulator of Hemostasis and Thrombosis. *Acta Haematol*, 128, 158–169. <http://doi.org/10.1159/000339426>
- Pinzón, C. E., Serrano, M. L., & Sanabria, M. C. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K / Akt) en humanos. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá*, 7(2), 47–66.
- Ruggeri, Z. (2007). The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res*, 120, s5–s9. <http://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.03.011>.The
- Sadler, J. E. (2005). von Willebrand factor : two sides of a coin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 1702–1709.
- Sánchez, S., López, F., & Carreño, L. (2011). Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide : más allá de las citocinas proinflamatorias. *Reumatol Clin*, 6(s3), 20–24. <http://doi.org/10.1016/j.reuma.2010.11.010>
- Seriolo, B., Accardo, S., & Cutolo, M. (1994). Von Willebrand factor and vascular injury in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53, 550–552.
- Stockschlaeder, M., Schneppenheim, R., & Budde, U. (2014). Update on von Willebrand factor multimers : focus on high- molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 25, 206–216. <http://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000065>
- Svirbely, J., & Emery, P. (2009). Serie Springer de algoritmos médicos.
- Villa-forte, A., & Mandell, B. F. (2011). Trastornos cardiovasculares y enfermedad reumatica. *Rev Esp Cardiol*, 64(9), 809–817. <http://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.05.009>
- Virgos, Nebra, S. (2004). Elevación del factor de von Willebrand y D-dímeros en pacientes con hipertensión arterial , lesión endotelial y cardiopatía isquémica. *Hipertensión*, 21(6), 290–295.
- Virgos, Nebra, Suárez, Cornudella, P. (2008). Factor de von Willebrand , lesión endotelial y cardiopatía isquémica. *Med Intensiva*, 32(3), 103–109.

12. Anexos

12.1 Anexo I: material y reactivos.

- Agarosa tipo V (Sigma-Aldrich).
- Albumina sérica bovina.
- Anticuerpo primario: anticuerpo de conejo anti-FvW humano (Dako Denmark).
- Anticuerpo secundario: conjugado de cabra anti IgG de conejo, IgG-HRP peroxidasa (Dako Denmark).
- Azul de bromofenol.
- Cámara para electroforesis vertical (Bio-rad mini-PROTEAN®).
- Cassete (8 x 10" Kyokko Green).
- Cloruro de sodio (J.T. Baker).
- Dodecil sulfato de sodio (Bio-rad).
- EDTA (J.T. Baker).
- Equipo de transferencia en semi-seco (Bio-rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell).
- Glicina (Sigma).
- Jeringa Hamilton.
- Kit de ELISA FvW (IMUBIND®).
- Luminol comercial (ImmunoCruz Western blotting luminol reagent).
- Membranas (Bio-rad Immun-Blot® PVDF).
- Metanol (Baker).
- Papel filtro (Bio-rad).
- Placa especial de revelado (X Ray Film Fuji Medical).
- Solución fijadora (Fujifilm).
- Solución reveladora (Fujifilm).
- Trizma base (Sigma).
- Tubos vacutainer, citrato de sodio al 3%.
- Urea (Sigma).

12.2 Anexo II: soluciones para electroforesis.

Solución gel de corrimiento:

TRIS base.....12.11 g.

SDS.....0.2 g.

Agua desionizada C.B.P.....200 ml.

Ph 8.8

Solución gel concentrador:

TRIS base.....1.54g.

SDS.....0.1g.

Agua desionizada C.B.P.....100ml.

Ph 6.8

Buffer para las muestras:

TRIS.....1.211g.

EDTA de sodio.....0.372g.

Agua desionizada.....100ml.

Solución de dilución de la muestra (SDM):

Agua desionizada.....9ml.

Urea.....4.8g.

SDS.....0.2g.

Buffer para las muestras.....1ml.

Ph 8

Preparar en este estricto orden.

Solución reguladora de electroforesis:

TRIS base.....12g.
Glicina.....57.6g.
SDS.....2g.
Agua desionizada C.B.P.....2000ml.
Ph 8.35

Gel de corrimiento 1.8%:

Agarosa tipo V.....0.126g.
Buffer de corrimiento.....7ml.

Gel concentrador 1%:

Agarosa tipo V.....0.02g.
Buffer concentrador.....2ml.

Preparación de la muestra:

SDM.....80ml.
Azul de bromofenol.....10ml.
Plasma.....20ml.

Azul de bromofenol 1%:

Agua destilada.....5ml
Azul de bromofenol.....0.05g

12.3 Anexo III: soluciones para western blot.

Buffer de transferencia:

Glicina.....1.46g.

TRIS base.....2.9g.

SDS.....0.1g.

Metanol.....100ml.

Agua desionizada C.B.P.....500ml.

Preparar siempre al momento para evitar la degradación de la urea y colocar el metanol hasta el final para prevenir su pérdida por evaporación.

Solución TBS 10x:

TRIS base.....12.11g.

NaCl.....40.03g.

Agua destilada C.B.P.....500ml.

Preparar primero con 400ml de agua destilada, ajustar Ph a 7.6 con Ácido Clorhídrico y aforar.

Solución TBS-T 0.15M a partir de TBS 10X:

TBS 10X.....100ml.

Tween 20.....1ml.

Agua destilada.....900ml.

Solución TBS-T 0.15M – albúmina:

TBS-T 0.15M.....10ml

Albumina.....0.03g

Anticuerpo primario proporción 1:2000:

TBS-T 0.15M.....10ml

Albumina.....0.03g

Ac. Primario.....5 μ

Anticuerpo secundario proporción 1:4000:

TBS-T 0.15M.....10ml

Albumina.....0.03g

Ac. Secundario.....3 μ

Soluciones del revelado (Para preparar luminol):

1) Solución A (50ml):

TRIS.....0.6g.

Luminol.....0.012g.

Peróxido de hidrogeno al 30%.....15.5ml.

Ph 8.7

Disolver primero el TRIS en el agua, después el resto de los componentes.

2) Solución B:

Acido P-cumárico.....0.01g.

DMSO.....5ml.

Mezclar 10ml de la solución A + 50 ml de la solución B.