



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

TITULO DE TESIS:

***“DETERMINACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES Y
BIOMARCADORES PROTROMBÓTICOS EN PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE.”***

PRESENTA

QUIMICA.FARMACOBIOLOGA NALLELY ITANDEHUI GARCÍA LARRAGOITI

DIRECTOR DE TESIS

DOCTORA EN CIENCIAS MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

CO-DIRECTOR DE TESIS

MEDICO REUMATOLOGO MIGUEL ANGEL ALVAREZ GUERRERO

Julio 2015

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 apoyo del proyecto de investigación MICH-2012-C03-193464 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

DEDICATORIAS

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres.

Por haberme apoyado incondicionalmente en todo momento, por sus consejos, sus valores, su confianza ciega en cualquier proyecto que emprendía, por su motivación constante, por el amor que siempre me han profesado y que me ha permitido lograr mis metas y ser la persona que soy ahora, los amo papitos son mi orgullo y mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos

Porqué, me han escuchado y aconsejado cuando lo he necesitado, por su fe en mi, por los buenos momentos y los ratos divertidos pero también por los malos que al final superamos juntos y nos han dejado sabias enseñanzas, a ustedes hermanitos por ser mis mejores amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la D.C. Martha Eva Viveros Sandoval

Por la confianza que ha depositado en mi, por sus valiosas enseñanzas, por inculcarme el amor por la investigación, por su apoyo, sus palabras de aliento, por impulsarme siempre a ser mejor, muchísimas gracias.

Al Dr. Carlos Arturo Areán Martínez

Por su valiosa colaboración en este trabajo, su apoyo en el transcurso del mismo, por la confianza que deposito en mi para realizarlo.

Al D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos y al Dr. Miguel Ángel Álvarez Guerrero

Por su compromiso con este trabajo, por sus consejos y valiosas aportaciones

A mis compañeros del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIAS..... III

AGRADECIMIENTOS.....IV

INDICE DE CONTENIDOS.....V

INDICE DE TABLAS.....VII

INDICE DE FIGURAS.....VIII

ABREVIATURAS IX

GLOSARIO. X

1. RESUMEN (ABSTRACT) 1

2. INTRODUCCIÓN 5

3. MARCO TEÓRICO..... 6

 3.1 ARTRITIS REUMATOIDE..... 6

 3.2 EPIDEMIOLOGIA..... 7

 3.3 FISIOPATOLOGIA..... 7

 3.4 ETIOLOGIA..... 9

 3.5 MANIFESTACIONES CLINICAS..... 10

 3.6 CRITERIOS DE CLASIFICACION 11

 3.7 DAS28..... 13

 3.8 NUEVOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE AR 15

 3.9 TRATAMIENTO.....17

 3.1.0 CITOCINAS EN LA PATOGENIA DE AR..... 18

 3.1.1 IL-6..... 18

 3.1.2 TNF- α 19

 3.1.3 ARTRITIS REUMATOIDE Y DAÑO ENDOTELIAL 20

 3.1.4 ATEROESCLEROSIS PREMATURA EN ARTRITIS REUMATOIDE 22

 3.1.5 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES..... 23

3.1.6	EL PAPEL DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (EPCs) EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.....	23
3.1.7	CUANTIFICACIÓN DE EPCs POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	25
4.	JUSTIFICACIÓN.....	28
5.	HIPÓTESIS.....	30
6.	OBJETIVOS.....	30
6.1	OBJETIVO GENERAL.....	30
6.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	30
7.	CRITERIOS.....	31
7.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	31
7.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	31
7.3	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	31
8.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
8.1	SITIO DE ESTUDIO.....	32
8.2	TIPO DE ESTUDIO.....	32
8.3	SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	32
8.4	TOMA DE MUESTRA.....	32
8.5	METODOLOGÍA.....	34
8.6	PREPARACION DE LOS TUBOS Y DE LA MUESTRA.....	34
8.7	ANALISIS. ADQUISICIÓN DE EPCs POR CITOMETRIA DE FLUJO.....	36
9.	ANALISIS ESTADISTICO.....	36
10.	ASPECTOS ETICOS.....	37
11.	RESULTADOS.....	38
12.	DISCUSION.....	53
13.	RESUMEN DE RESULTADOS.....	61
14.	CONCLUSION.....	62
15.	PERSPECTIVAS.....	63

16. REFERENCIAS.....	64
17. ANEXOS.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conjunto de variables y puntuación de cada una de las variables para el cómputo global.....	16
Tabla 2. <i>Puntos de corte sugeridos por diferentes grupos de trabajo para las unidades de reacción P2Y12 (PRU) medido por VerifyNow.....</i>	20
Tabla 3. <i>Preparación de los tubos y de la muestra para análisis por citometría de flujo.....</i>	34
Tabla 4. <i>Características demográficas y clínicas de la población de estudio.....</i>	38
Tabla 5. <i>Correlación de Pearson para las variables cuantitativas EPCs vs DAS28.....</i>	39
Tabla 6. <i>Estadísticos descriptivos IRP toma post carga y 24 horas.....</i>	42
Tabla 7. <i>Estadísticos descriptivos PRU toma post carga y 24 horas.....</i>	44
Tabla 8. <i>Comparación del IRP, PRU TPC y del IRP, PRU T24 de acuerdo al genero.....</i>	45
Tabla 9. <i>Correlación del IRP y PRU toma post carga con los datos clínicos y demográficos de la población de estudio.....</i>	46
Tabla 10. <i>Correlación del IRP y PRU toma 24 horas con los datos clínicos y demográficos de la población de estudio.....</i>	47
Tabla 11. <i>Comparación de los datos de laboratorio contra IRP y PRU TPC.....</i>	48
Tabla 12. <i>Distribución individual en cuartiles de la respuesta a Clopidogrel mediante el IRP TPC medido por VASP.....</i>	49

Tabla 13. *Distribución individual de la respuesta a Clopidogrel con un punto de corte del IRP-VASP TPC de 69%.....* 50

Tabla 14. *Distribución individual de la respuesta a Clopidogrel mediante PRU medido por VerifyNow.....* 51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Artritis Reumatoide 6

Figura 2. Angioplastia con implantación de endoprótesis vascular (stent) 22

Figura 3. Estadios de maduración de las células progenitoras endoteliales..... 27

Figura 4. Comparación EPCs 40

Figura 5. Grafico de dispersión PRU vs Inhibición 41

Figura 6. Determinación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la evaluación del IRP toma post carga a las 24 horas de su administración. 43

Figura 7. Determinación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la evaluación del PRU toma post carga a las 24 horas de su administración.....44

Figura 8. Distribución y variabilidad individual de índice de reactividad plaquetaria (IRP) medido por VASP en cuartiles.....49

Figura 9. Distribución y variabilidad individual de índice de reactividad plaquetaria (IRP) medido por VASP con punto de corte del 69% 50

Figura 10. Distribución y variabilidad individual de las Unidades de reacción P2Y₁₂ medido por VerifyNow Utilizando un punto de corte de >230 para pacientes no respondedores al tratamiento con Clopidogrel 52

ABREVIATURAS

ADP. Adenosin difosfato de Sodio.

AMPc. Adenosin monofosfato cíclico.

CAD. Enfermedad arterial coronaria (Coronary artery disease).

CMF. Citometría de flujo.

COX-1. Cicloxigenasa 1

ECV. Enfermedad cardiovascular.

FVW. El factor de von Willebrand, además de su función de proteína protectora del factor VIII, es un mediador de la adhesión de plaquetas en los lugares con daños vasculares e interviene en la agregación plaquetaria.

HRPR. Alta reactividad plaquetaria residual (High residual platelet reactivity).

IAM. Infarto agudo al miocardio.

ICP. Intervención Coronaria Percutánea.

MFic. Índice medio de fluorescencia corregido.

PGE1. Prostaglandina E1.

PRP. Plasma rico en plaquetas.

PRU. Unidades de reacción P2Y₁₂.

IRP. Índice de reactividad plaquetaria.

SCA. Síndrome Coronario Agudo.

TAX₂. Tromboxano A₂.

VASP. Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.

GLOSARIO.

Agonista. Sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular y provocar una respuesta en la célula con el fin de estimular una función, ya sea específica o adversa.

Angiografía. Técnica radiográfica que emplea un colorante que se inyecta en las cavidades del corazón o en las arterias que conducen al corazón (las arterias coronarias). El estudio permite medir el flujo de sangre y la presión en las cavidades cardíacas y determinar si las arterias coronarias están obstruidas.

Angioplastia. Procedimiento que consiste en introducir un balón para dilatar una arteria ocluida (total o parcialmente), con el fin de restaurar el flujo sanguíneo, obstruido por placas de colesterol y/o trombo.

Captosina. Proteína con actividad proteolítica cataliza la hidrólisis de proteínas a polipéptidos. Se encuentra en muchos tipos de células, incluyendo a todas las células de animales. La mayoría se activan al pH ácido que hay en el interior de los lisosomas, por lo que su actividad suele darse en el interior de dichos orgánulos.

Colagenasa. Enzima, mas específicamente una metaloproteinasa de matriz que rompe los enlaces peptídicos de los colágenos que pueden ser tipo (I, II, III, IV, V) y que contiene zinc. Son una familia de enzimas de diversos orígenes celulares y especificidades para distintos sustratos. Estas enzimas aparte de degradar al colágeno activan la TNF-alpha. La colagenasa puede ser producida durante una respuesta inmunológica, por la citocina que estimula células como los fibroblastos y los osteoblastos, requieren iones de calcio para entrar en actividad.

Dopamina. Neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendócrina.

Enfermedad de von Willebrand. Trastorno hemorrágico hereditario más común en los seres humanos. La característica central de todos los tipos de EVW es la presencia de cantidades reducidas de FVW o de formas anormales del FVW en el torrente sanguíneo.

Glicoproteína. Moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Tienen entre otras funciones el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas.

Hemostasis. Conjunto de mecanismos aptos para detener los procesos hemorrágicos; en otras palabras, es la capacidad que tiene un organismo de hacer que la sangre en estado líquido permanezca en los vasos sanguíneos. La hemostasia permite que la sangre circule libremente por los vasos y cuando una de estas estructuras se ve dañada, permite la formación de coágulos para detener la hemorragia, posteriormente reparar el daño y finalmente disolver el coágulo.

Homeostasis. Tendencia de los organismos vivos y otros sistemas a adaptarse a las nuevas condiciones y a mantener el equilibrio a pesar de los cambios.

Integrinas. Las integrinas forman parte de las moléculas de adhesión celular (CAMs: Cell Adhesion Molecules). Son proteínas de membrana formadas por dos cadenas, la alfa y la beta. Participan en interacciones con proteínas CAMs de otras súper familias en las que se requiere, en muchos casos, la participación de cationes divalentes como el calcio o el magnesio. Las integrinas pueden interactuar con componentes de la matriz extracelular y, a nivel intracelular, interactúan con proteínas que las conectan funcionalmente con el citoesqueleto y con enzimas que desencadenan cascadas de señalización. Estas rutas de señalización son integradas en la célula junto con otras señales, a veces procedentes de otros tipos de CAMs, pudiendo respuestas tan diversas como la proliferación, la migración, la diferenciación, la muerte o la activación, según el caso. Las integrinas juegan un papel

importante en la patogenia de múltiples enfermedades autoinmunes y en el desarrollo de metástasis en los procesos tumorales.

Interleucinas. Conjunto de citocinas (proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia) que son sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque en algún caso también pueden intervenir células endoteliales, del estroma del timo o de la médula ósea. Su principal función es regular los eventos que atañen a las funciones de estas poblaciones de células del sistema inmunitario, como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis, regulación de otras citocinas y factores, entre otras. Han sido descritas distintas alteraciones de ellas en enfermedades autoinmunes o en inmunodeficiencias.

Megacariocito. Célula del tejido hematopoyético que deriva de la serie mieloide. En el proceso de diferenciación el megacariocito pasa por diferentes etapas que implican la división del núcleo sin división del citoplasma. Se forma así una célula poliploide de gran tamaño (60 micras o más) que permanece alojada en la médula junto a los vasos sanguíneos y emite una serie de fragmentos celulares al torrente sanguíneo. Estos fragmentos celulares son las plaquetas.

Prostaglandinas. Lípidos mediadores autocrinos y paracrinos que actúan sobre las plaquetas, el endotelio, las células uterinas y los mastocitos, entre otros. Se sintetizan en las células a partir de los ácidos grasos esenciales.

Quelante. Compuesto químico que se une con firmeza a los iones metálicos. En el campo de la medicina, los quelantes se usan para extraer metales tóxicos del cuerpo. También están en estudio para el tratamiento de cáncer.

Síndrome de Bernard-Soulier. Segundo más común trastorno hemorrágico hereditario que se produce como consecuencia de defectos en la función plaquetaria. Se caracteriza por, entre otros síntomas, la presencia de plaquetas gigantes.

Trombastenia de Glanzmann. Defecto plaquetario congénito infrecuente, con una incidencia de 1 por millón que se hereda en forma autosómica recesiva.

Trombocitopenia. Nivel anormalmente bajo de plaquetas en la sangre.

Trombopoyesis. Proceso de formación de nuevas plaquetas o trombocitos.

1. RESUMEN

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica y progresiva, caracterizada por la inflamación, dolor y destrucción ósea en las articulaciones periféricas que da por resultado deformidad y reducción de la capacidad funcional igualmente creciente que llega incluso a la invalidez, afecta aproximadamente al 1-2% de la población mundial, principalmente al grupo con mayor capacidad productiva y laboral dentro de la sociedad. Entre los pacientes con AR, la enfermedad cardiovascular (ECV) es la causa más importante de mortalidad y morbilidad. Sin embargo, el desarrollo acelerado de la aterosclerosis observada en los pacientes con AR no puede ser completamente explicada por los factores de riesgo de Framingham tradicionales por lo que se ha propuesto que la inflamación sistémica y los mecanismos relacionados con la enfermedad podrían desempeñar un papel fundamental en el aumento de riesgo cardiovascular. Diversos estudios clínicos y experimentales sugieren que los niveles de células progenitoras endoteliales se correlacionan con la inflamación sinovial y aumento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular. A pesar de la información con la que se cuenta la función exacta de las EPCs en la patogénesis de la AR aún no se conoce, y su papel como un marcador pronóstico no está claro, por lo que es de suma importancia el estudio de estas células como un nuevo marcador diagnóstico y pronóstico, relacionándolo con la cuantificación de otros biomarcadores, así como con las características clínicas de los pacientes.

OBJETIVOS: Evaluar la correlación entre los niveles de Células Progenitoras Endoteliales por citometría de flujo con el grado de disfunción endotelial en pacientes con Artritis Reumatoide así

como biomarcadores protrombóticos y de inflamación mediante ELISA y compararlos con controles sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio de cohorte, casos y controles, comparativo, prolectivo, transversal. Se obtendrá una muestra de sangre venosa periférica para la cuantificación de las células progenitoras endoteliales mediante citometría de flujo por previa inmunofenotipificación utilizando anticuerpos monoclonales CD133, CD45, CD34 y KDR, así como para el análisis de biomarcadores protrombóticos y de inflamación por ELISA, se realizara también Biometría Hemática completa, Velocidad de Sedimentación Globular, Proteína C reactiva.

RESULTADOS: Los resultados observados concuerdan con los reportados en la literatura y sugieren que niveles disminuidos de EPCs pudieran estar siendo afectados por la inflamación crónica presente en pacientes con AR. Por otro lado los niveles incrementados de EC observados en pacientes con AR parecen indicar que estos pacientes presentan un proceso de apoptosis inducida por pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular o por interacciones célula-matriz inapropiadas lo cual sugiere que a mayor actividad de la enfermedad mayor es el daño endotelial. Por otro lado las concentraciones de IL-6, TNF- α y P-selectina fueron significativamente mayores en el grupo con AR que en el grupo CS lo que apoya el uso de EPCs e interleucinas como biomarcadores indirectos de daño endotelial y alto riesgo cardiovascular. **CONCLUSIÓN.** Los porcentajes de IEPCs y EC y las concentraciones de IL-6, TNF- α y P-selectina varían en los diferentes grados de actividad de la AR.

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic progressive autoimmune disease characterized by inflammation, pain and bone destruction in peripheral joints resulting deformity and reduced functional capacity also increased which even disability, affecting about 1-2% of the world population, mainly the group more productive and labor capacity within society. Among patients with rheumatoid arthritis, cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of mortality and morbidity. However, the accelerated development of atherosclerosis observed in patients with RA can not be fully explained by so has been proposed traditional risk factors Framingham that systemic inflammation and disease-related mechanisms could play a key role in increasing cardiovascular risk. Various clinical and experimental studies suggest that the levels of endothelial progenitor cells correlate with the synovial inflammation and increased cardiovascular morbidity and mortality. Despite the information that the exact role of EPCs in the pathogenesis of RA is not yet known, and its role as a prognostic marker is unclear counts, so it is important to study these cells as a new diagnostic and prognostic marker, relating to the quantification of other biomarkers, as well as the clinical characteristics of patients.

OBJETIVE: To evaluate the correlation between the levels of Endothelial Progenitor Cells by flow cytometry with the degree of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory and prothrombotic biomarkers by ELISA and compared with healthy controls.

MATERIALS AND METHODS: Cohort study, case-control, comparative, prolective, cross. A sample of peripheral venous blood was obtained for quantitation of endothelial progenitor cells by flow

cytometry using CD133 prior immunophenotyping, CD45, CD34 and KDR monoclonal antibodies and for analyzing thrombotic and inflammatory biomarkers by ELISA, be held Biometrics also complete blood count, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein.

RESULTS: The observed results agree with those reported in the literature and suggest that decreased levels of EPCs may be being affected by chronic inflammation present in patients with RA. Moreover increased levels of EC observed in RA patients suggest that these patients are undergoing apoptosis induced by loss of attachment of the cell to the extracellular matrix or cell-matrix interactions inappropriate suggesting that higher activity most disease is endothelial damage. On the other hand the concentrations of IL-6, TNF- α and P-selectin were significantly higher in the group with RA than in the CS group that supports the use of EPCs and interleukins as indirect biomarkers of endothelial damage and high cardiovascular risk.

CONCLUSION. IEPCs percentages and EC and concentrations of IL-6, TNF- α and P-selectin vary in different degrees of activity of RA.

2. INTRODUCCIÓN

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica y progresiva, caracterizada por la inflamación, dolor y destrucción ósea en las articulaciones periféricas que da por resultado deformidad y reducción de la capacidad funcional igualmente creciente que llega incluso a la invalidez, afecta principalmente al grupo con mayor capacidad productiva y laboral dentro de la sociedad. Entre los pacientes con AR, la enfermedad cardiovascular (ECV) es la causa más importante de mortalidad y morbilidad.

Sin embargo, el desarrollo acelerado de la aterosclerosis observada en los pacientes con AR no puede ser completamente explicada por los factores de riesgo de Framingham tradicionales por lo que se ha propuesto que la inflamación sistémica y los mecanismos relacionados con la enfermedad podrían desempeñar un papel fundamental en el aumento de riesgo cardiovascular.

Diversos estudios clínicos y experimentales sugieren que los niveles de células progenitoras endoteliales se correlacionan con la inflamación sinovial y aumento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular. A pesar de la información con la que se cuenta la función exacta de las EPCs en la patogénesis de la AR aún no se conoce, y su papel como un marcador pronóstico no está claro, por lo que es de suma importancia el estudio de estas células como un nuevo marcador diagnóstico y pronóstico, relacionándolo con la cuantificación de otros biomarcadores, así como con las características clínicas de los pacientes.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, sistémica y de etiología desconocida caracterizada por inflamación articular crónica que provoca destrucción progresiva de la misma con distintos grados de deformidad e incapacidad funcional (Mody GM, Cardiel HM 2008). También pueden aparecer manifestaciones extraarticulares lo que conduce a una disminución en la calidad de vida y un aumento de la morbilidad y mortalidad.

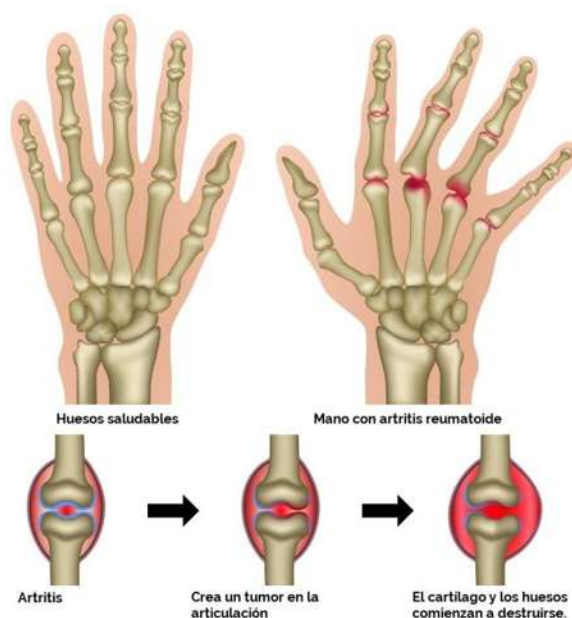


Figura 1. La artritis reumatoide provoca que las articulaciones y los tejidos se inflamen, por esta razón se dificulta el movimiento normal de las rótulas; es una enfermedad autoinmune, lo que quiere decir que es el propio organismo que se ataca así mismo por error.

3.2 EPIDEMIOLOGIA

La artritis reumatoide (AR) afecta alrededor del 1-2% (Sang-Cheol y cols. 2009) de la población a nivel mundial. La edad de inicio aproximado es de 40 ± 10 años aunque puede iniciar a una edad más temprana, es más frecuente en mujeres que en hombres, con una relación 3-5:1. En México afecta al 0.3-1% de la población en general, siendo el principal motivo de consulta en el Servicio de Reumatología (Mendoza-Vázquez y cols. 2013).

3.3 FISIOPATOLOGIA.

Dentro de la fisiopatología de la AR las articulaciones diartroideas, es decir las que tienen membrana sinovial se consideran especialmente importantes ya que es el órgano de choque de este padecimiento sistémico. Estas articulaciones sinoviales están conformadas de dos extremos óseos recubiertos por cartílago hialino, metabólicamente activo y formado por fibras de colágeno tipo II así como proteoglicanos, una capsula articular donde se encuentran los sinoviocitos A que son fagocíticos y los de tipo B parecidos a los fibroblastos que produce el líquido sinovial el cual contiene ácido hialurónico y lubricina. El ácido hialurónico es el encargado de lubricar la cápsula articular, mientras que la lubricina lubrica el cartílago. El fluido sinovial actúa como transportador de nutrientes y como medio de eliminación de los productos metabólicos de las estructuras vasculares de la articulación (Guzmán 2007, Tercero MJ y Olalla R 2010).

La inflamación y la destrucción articular características de la AR, son procesos complejos multicelulares, en los cuales se pueden distinguir tres fases más o menos distintivas y muchas veces yuxtapuestas. La primera es una fase de inducción que precede a las manifestaciones clínicas, la segunda fase es la inflamatoria articular de la enfermedad y por último la tercera fase que corresponde a la destrucción articular (Rojas y cols. 2010).

En pacientes con Ar la membrana sinovial se caracteriza por hiperplasia e infiltración de linfocitos T activados, macrófagos y linfocitos B. La célula mononuclear más notable es la célula T CD4+, la cual se infiltra en regiones intermedias y profundas del sinovio. Las células B y las células dendríticas forman agregados con las células T y los macrófagos del tejido y en aproximadamente un 20% de los pacientes forman estructuras parecidas a los folículos linfoides. La producción local de autoanticuerpos y otras inmunoglobulinas resulta en la formación de inmunocomplejos. Los autoanticuerpos (conocidos como factor reumatoide) son de tipo IgG. Componentes articulares tales como colágeno tipo II y proteoglicanos, se unen a la porción Fc de la IgG.

Las células T acumuladas en el sinovio son relativamente poco reactivas y la mayoría de sus productos están presentes en niveles bajos, en comparación con los elevados niveles que estarían presentes en una típica respuesta antígeno-dependiente in vivo. Sin embargo, productos como la IL-17 y el interferón gamma IFN γ se encuentran en concentraciones relevantes. En contraste, los sinoviocitos y macrófagos producen IL-1,

TNF α , e IL-18, los cuales se presentan en niveles elevados en el sinovio de pacientes con AR y probablemente contribuyen a la inflamación sinovial.

3.4 ETIOLOGIA.

La artritis reumatoide es multifactorial y de origen desconocido. Sin embargo sea asociado a diversos factores entre las que se encuentran:

- *Anormalidades inmunorreguladoras y autoinmunidad.* Estas originan alteraciones en la composición del fluido sinovial, el cual se hace rico en citocinas proinflamatorias y enzimas proteolíticas potencialmente dañinas para el cartílago articular, por lo que pierde capacidad para realizar sus funciones fisiológicas (Tercero MJ y Olalla R 2010)
- *Factores genéticos.* Se han relacionado los genes clase II de los Antígenos Leucocitarios de Histocompatibilidad entre los que destacan los genes DR en el desarrollo, severidad y pronóstico de la enfermedad (Rivas A. y cols. 2010).
- *Procesos infecciosos.* Se cree que el factor que inicia la enfermedad es un agente microbiano, aunque aun se desconoce cuál. Se sospecha del virus EpsteinEpstein-Barr, pero podrían ser otros: retrovirus, parvovirus, micobacterias, borrelia, mycoplasma, etc. Los datos que inculpan en mayor medida al virus Epstein-Barr incluyen que en la mayoría de pacientes aparecen reacciones autoinmunes contra una sustancia proteínica del cartílago (el colágeno tipo II). El virus Epstein-Barr y el colágeno tipo II tienen estructuras similares (Alcalde M. y cols. 2003).

- *Hormonales.* La mayor prevalencia de AR en mujeres, especialmente durante los años fértiles y la frecuente mejoría de la enfermedad durante el embarazo obligan a considerar el posible papel hormonal en la susceptibilidad a la enfermedad.
- *Ambientales* como el tabaquismo. El tabaco es el factor de riesgo ambiental para el desarrollo de la AR más ampliamente estudiado y reconocido. Hace ya más de 20 años que Vassey y cols sugirieron por primera vez su implicación en la AR al observar inesperadamente dicho efecto en su estudio sobre el efecto de los anticonceptivos orales en la AR. Desde entonces este efecto del tabaco ha sido reproducido y confirmado en múltiples estudios de casos y controles y cohortes (Ruiz-Esquide V. y Sanmartí R. 2012).
- Factores dietéticos. Se ha sugerido que la dieta mediterránea, rica en pescado, aceite de oliva, verduras cocidas y fruta ha mostrado tener un papel protector frente a la AR lo que podría deberse al alto contenido de ácidos grasos omega 3 de estos alimentos (Rosell M. y cols. 2009)

3.5 MANIFESTACIONES CLINICAS

El cuadro clínico clásico de la Ar usualmente se manifiesta después de varios meses del inicio de la enfermedad. Por lo general se afectan las muñecas y las articulaciones metacarpofalángicas y las interfalángicas de ambas manos. El curso natural de la

enfermedad en la mayoría de los pacientes involucra la inflamación crónica de varias articulaciones, con periodos de mayor intensidad. Aproximadamente en dos terceras partes de los pacientes comienza de forma insidiosa con fatiga, anorexia, debilidad generalizada y sintomatología musculoesquelética vaga, hasta que se hace evidente la sinovitis.

3.6 CRITERIOS DE CLASIFICACION

El Colegio Americano de Reumatología estableció en 1987 los 7 criterios de diagnóstico de la artritis reumatoide. Estos criterios tienen buena sensibilidad y especificidad para clasificar la enfermedad ya establecida. Se considera el diagnóstico de artritis reumatoide cuando están presentes 4 o más criterios de los 7 siguientes (Arnett F y cols 1988)

- 1) Rigidez articular matutina de al menos una hora de duración.
- 2) Artritis de tres o más grupos articulares. Inflamación simultánea de al menos tres grupos articulares objetivada por un médico. los catorce grupos articulares son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsfalángicas.
- 3) Artritis de articulaciones de las manos. Inflamación de al menos un grupo o área articular en las manos (carpo, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales).

- 4) Artritis simétrica. Afectación simultánea del mismo grupo articular en ambos lados del cuerpo.
- 5) Nódulos reumatoides. Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, en superficies de extensión o en zonas yuxtaarticulares, observados por un médico.
- 6) Factor reumatoide en suero. Presencia de valores elevados de factor reumatoide.
- 7) Alteraciones radiológicas típicas de artritis reumatoide en radiografías posteroanteriores de las manos. Debe existir erosión u osteoporosis yuxta-articular clara y definida en las articulaciones afectadas.

Estos criterios funcionan peor en la enfermedad de reciente comienzo. En esta etapa los criterios clínicos (del primero al cuarto) son sensibles pero poco específicos de artritis reumatoide, mientras que el resto son poco sensibles aunque muy específicos. De las pruebas biológicas actuales, el factor reumatoide y los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados son los que presentan una mayor utilidad diagnóstica en la enfermedad de reciente comienzo. Un líquido sinovial inflamatorio confirma el diagnóstico de artritis, pero es poco específico de la artritis reumatoide; los reactantes de fase aguda, velocidad de sedimentación globular y proteína C reactiva reflejan la presencia e intensidad de un proceso inflamatorio pero no son específicos de la artritis reumatoide, la detección del factor reumatoide en un paciente con poli artritis hace probable el diagnóstico de artritis reumatoide, pero su ausencia no la excluye (su sensibilidad oscila entre 40-80%). El factor

reumatoide tiene un valor pronóstico, ya que se asocia a enfermedad más grave con más extensión del compromiso articular, mayor destrucción y discapacidad. Puede aparecer años antes de la aparición de los síntomas de la artritis, los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados tienen una sensibilidad similar a la del factor reumatoide para el diagnóstico de la artritis reumatoide, pero mayor especificidad (95%). Su aparición puede preceder en años a la enfermedad y se relaciona con su pronóstico evolutivo (Alcalde M. y cols 2003)

3.7 DAS28

El Colegio Americano de Reumatología estableció en 1987 los 7 criterios de diagnóstico de la artritis reumatoide. Estos criterios tienen buena sensibilidad y especificidad para clasificar la enfermedad ya establecida. Se considera el diagnóstico de artritis reumatoide cuando están presentes 4 o más criterios de los 7 siguientes:

- 1) Rigidez articular matutina de al menos una hora de duración.
- 2) Artritis de tres o más grupos articulares. Inflamación simultánea de al menos tres grupos articulares objetivada por un médico. los catorce grupos articulares son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas.

- 3) Artritis de articulaciones de las manos. Inflamación de al menos un grupo o área articular en las manos (carpo, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales).
- 4) Artritis simétrica. Afectación simultánea del mismo grupo articular en ambos lados del cuerpo.
- 5) Nódulos reumatoides. Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, en superficies de extensión o en zonas yuxtaarticulares, observados por un médico.
- 6) Factor reumatoide en suero. Presencia de valores elevados de factor reumatoide.
- 7) Alteraciones radiológicas típicas de artritis reumatoide en radiografías posteroanteriores de las manos. Debe existir erosión u osteoporosis yuxta-articular clara y definida en las articulaciones afectadas.

Estos criterios funcionan peor en la enfermedad de reciente comienzo. En esta etapa los criterios clínicos (del primero al cuarto) son sensibles pero poco específicos de artritis reumatoide, mientras que el resto son poco sensibles aunque muy específicos. De las pruebas biológicas actuales, el factor reumatoide y los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados son los que presentan una mayor utilidad diagnóstica en la enfermedad de reciente comienzo. Un líquido sinovial inflamatorio confirma el diagnóstico de artritis, pero es poco específico de la artritis reumatoide; los reactantes de fase aguda, velocidad de sedimentación globular y proteína C reactiva reflejan la presencia e intensidad de un proceso inflamatorio pero no son específicos de la artritis reumatoide, la detección del

factor reumatoide en un paciente con poli artritis hace probable el diagnóstico de artritis reumatoide, pero su ausencia no la excluye (su sensibilidad oscila entre 40-80%). El factor reumatoide tiene un valor pronóstico, ya que se asocia a enfermedad más grave con más extensión del compromiso articular, mayor destrucción y discapacidad. Puede aparecer años antes de la aparición de los síntomas de la artritis, los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados tienen una sensibilidad similar a la del factor reumatoide para el diagnóstico de la artritis reumatoide, pero mayor especificidad (95%). Su aparición puede preceder en años a la enfermedad y se relaciona con su pronóstico evolutivo.

3.8 NUEVOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE AR

En septiembre de 2010 se publican simultáneamente en Annals of Rheumatic Diseases y Arthritis and Rheumatism los nuevos criterios de clasificación para la artritis reumatoide (AR), como conclusión del esfuerzo conjunto realizado por la EULAR y el ACR con el fin de mejorar los criterios de clasificación utilizados hasta ahora.

Estos nuevos criterios tienen un objetivo muy claro, mejorar la clasificación de la AR de corta evolución, de manera que se pueda establecer un tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) lo antes posible. Como segundo objetivo, establecen la definición de caso para poder llevar a cabo ensayos terapéuticos en pacientes con AR de corta evolución.

Los nuevos criterios de AR sólo se aplicarán a una determinada población diana que debe tener las siguientes características:

- Presentar al menos 1 articulación con sinovitis clínica (al menos una articulación inflamada) y que dicha sinovitis no pueda explicarse por el padecimiento de otra enfermedad.
- Tener una puntuación igual o superior a 6 en el sistema de puntuación que se presenta en la tabla 1 y que considera la distribución de la afectación articular, serología del factor reumatoide (FR) y/o ACPA, aumento de los reactantes de fase aguda y la duración igual o superior a 6 semanas.

Estos criterios también permiten hacer el diagnóstico en aquellos pacientes que presenten una AR evolucionada siempre y cuando tengan erosiones típicas de AR (Reumatol Clin. 2011).

Tabla 1. Conjunto de variables y puntuación de cada una de las variables para el cómputo global. Un paciente será clasificado de AR si la suma total es igual o superior a 6.

Afectación articular	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	3
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
Serología	
FR y ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivos bajos (< 3 VN)	2
FR y/o ACPA positivos alto (> 3 VN)	3
Reactantes de fase aguda VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
Duración	
<6 semanas	0
≥6 semanas	1

3.9 TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento en la AR es conseguir una disminución de la actividad inflamatoria suficiente para obtener un alivio sintomático significativo para el paciente, preservar su capacidad

funcional para realizar las actividades cotidianas, incluyendo la capacidad laboral, y mejorar su calidad de vida, el retraso o detención de la lesión estructural articular, así como la prevención de la morbilidad y la mortalidad. Generalmente el tratamiento consiste en combinación de AINE, fármacos modificadores de la enfermedad (FAME), y/o glucocorticoides (Alcalde M. y cols 2003). Por otro lado el tratamiento no farmacológico comprende la rehabilitación con el fin de facilitar, mantener o devolver el mayor grado de capacidad funcional e independencia posible.

Su finalidad es tratar las consecuencias de la enfermedad y prevenir el deterioro funcional. Se han implementado también el uso de tratamientos físicos entre los cuales podemos destacar la estimulación eléctrica nerviosa transcutánea (Tercero MJ y Olalla R 2010).

3.1.0 CITOCINAS EN LA PATOGENIA DE AR

La secreción de citocinas constituye un mecanismo fundamental en la modulación de la respuesta inmunológica. El patrón de secreción de estas moléculas determina el tipo de respuesta inmunológica que se confrontará con un antígeno particular. Las células en la membrana sinovial inflamada y en el pannus elaboran citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 e IL-23, que contribuyen a la inflamación y que pueden afectar directamente al hueso (Sánchez-Ramón S y cols. 2011).

3.1.1 IL-6

La AR fue una de las primeras enfermedades inflamatorias en que se describió un importante aumento de la expresión de la IL-6, detectable tanto en el plasma como en el

tejido sinovial. El aumento en el plasma fluctúa rápidamente en sentido concordante con la actividad, la severidad y la respuesta positiva a las terapias. Los principales efectos del aumento sistémico de IL-6 en la AR son el aumento de los RFA y, por lo tanto, la amiloidosis secundaria, la anemia de enfermedad crónica y posiblemente la osteoporosis sistémica así como el incremento del riesgo vascular (Pablos Álvarez JL 2009).

3.1.2 TNF- α

Los niveles de TNF- α se incrementan en la AR y se correlacionan con la enfermedad cardiovascular debido a que puede desempeñar un papel importante en el inicio y la perpetuación de las lesiones ateroscleróticas tradicionales en los pacientes con AR ya que aumenta las células endoteliales (CE), moléculas de adhesión y niveles de proteínas quimiotácticas que promueven el reclutamiento de células mononucleares en la pared endotelial además de que elimina la expresión del receptor en los macrófagos por lo que agrava la formación de células espumosas. Algunos estudios han propuesto los tratamientos anti-TNF en pacientes con AR para mejorar la función endotelial, el perfil de lípidos y la resistencia a la insulina sin embargo aun no queda claro pero si estos efectos son sostenidos y significativos dejando el papel de TNF en la AR y ECV abierto a debate (Kahlenberg y Kaplan 2013).

Tabla 2. Puntos de corte sugeridos por diferentes grupos de trabajo para las unidades de reacción P2Y₁₂ (PRU) medido por VerifyNow.

ESTUDIO	PACIENTES	NUMERO DE PACIENTES	TRATAMIENTO	PUNTO DE CORTE
Price y cols. (2008)	ICP	380	600 mg Clopidogrel previo ICP 75 mg Clopidogrel mantenimiento	≥235 PRU
Patti y cols. (2008)	ICP	160	600 mg Clopidogrel previo ICP 75 mg Clopidogrel mantenimiento	≥240 PRU
Marcucci R. (2009)	ICP/SCA	683	600 mg Clopidogrel previo ICP 75 mg Clopidogrel mantenimiento	≥240 PRU
Valgimigli y cols. (2009)	ICP	1277	600 mg Clopidogrel previo ICP	>235 PRU
Breet y cols. (2010)	ICP	1069	Clopidogrel 75 mg >5 días 300 mg ≥ 24 horas antes de ICP o 600 mg ≥ 4 horas antes de ICP 80-100 mg Aspirina ≥ 10 días	>236 PRU
Thomas Gremmel cols. (2011)	HRPR	46	(n=23) 100 mg Aspirina, 75 mg Clopidogrel (n=23) 100 mg Aspirina, 150 mg/d Clopidogrel	> 235 PRU
Pettersen y cols. (2011)	CAD	219	160 mg Aspirina 75 mg Clopidogrel	≥ 170 PRU
Price y cols. (2011)	ICP	5429	600 mg Clopidogrel previo ICP 75 mg Clopidogrel mantenimiento	≥ 230PRU
Sung Gyun Ahn cols. (2011)	IAM	1226	600 mg Clopidogrel previo ICP	≥272 PRU
Haraguchi K. y cols (2012)	Neuro intervención	163	75 md Clopidogrel 200 mg Cilostazol	>230 PRU
Codner P. y cols. (2012)	IAM/ICP	57	100 mg Aspirina, 600 mg Clopidogrel previo ICP , 75 mg Clopidogrel mantenimiento	≥235 PRU

3.1.3 ARTRITIS REUMATOIDE Y DAÑO ENDOTELIAL

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son enfermedades del sistema circulatorio, de etiología y localización diversas. Se clasifican en seis tipos generales según la Organización

Mundial de la Salud (OMS): cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatías congénitas y trombosis venosas profundas y embolias pulmonares.

Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo, se calcula que en 2004 murieron por esta causa 17,3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo, Se calcula que en 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte.(OMS). En México las ECV ocupan el segundo lugar de mortalidad con 59,579 defunciones al año, y en Michoacán ocupan el primer lugar con 3,746 defunciones por año (SINAIS 2008).

La Angioplastia Coronaria es un método invasivo no quirúrgico de recanalización arterial, con la cual pueden beneficiarse aquellos pacientes con angina de pecho o con evidencia objetiva de isquemia miocárdica y que presentan obstrucciones en los vasos coronarios (27). Al determinar la lesión, se hace pasar un catéter con un balón en la punta desde la arteria femoral o radial hasta llegar a la zona afectada en la arteria del corazón (esto se conoce como angioplastía coronaria transluminal percutánea o ACTP). Luego, el balón se infla, comprime la placa y ensancha la arteria coronaria obstruida para que la sangre pueda fluir con más facilidad. Con frecuencia, se acompaña de la implantación de una endoprótesis vascular (stent) metálica expandible. Las endoprótesis vasculares (stents) son tubos de malla metálica que se usan para mantener las arterias abiertas después de una ACTP (63).

Sin embargo, la rotura de la placa aterosclerótica coronaria, ya sea de manera espontánea o inducida (al ensanchar la luz vascular en la ICP) provoca una lesión en el

endotelio exponiendo componentes de la matriz vascular que inducen a la activación de, las plaquetas circulantes creando un ambiente protrombótico (28).

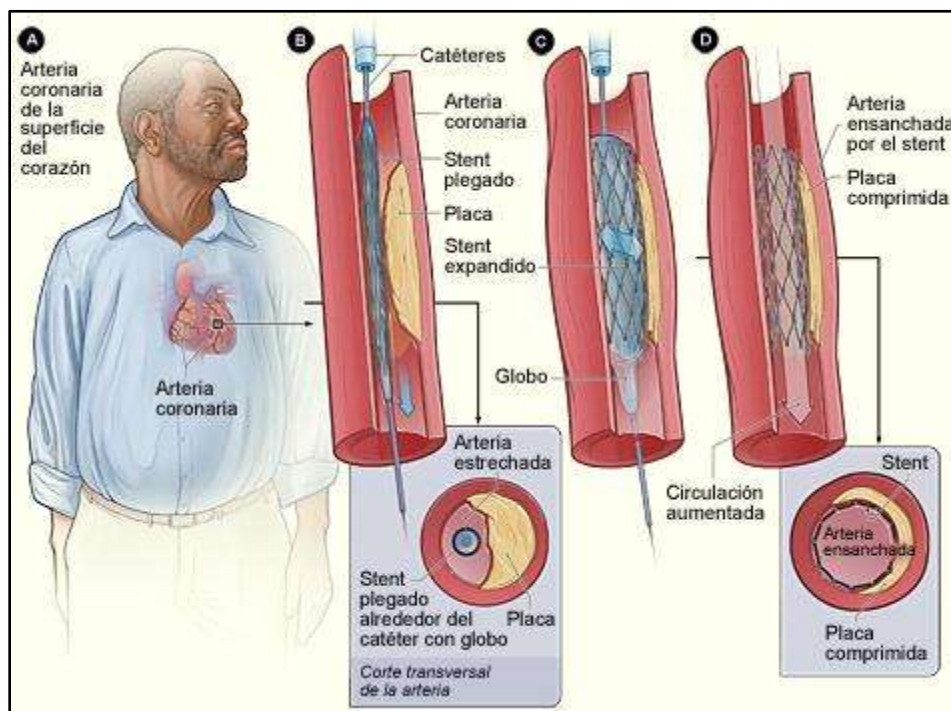


Fig. 2 Angioplastia con implantación de endoprótesis vascular (stent)

3.1.4 ATEROESCLEROSIS PREMATURA EN ARTRITIS REUMATOIDE

Se ha demostrado que las plaquetas desempeñan un papel preponderante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares más comunes, incluyendo los síndromes coronarios agudos, el infarto cerebral, la enfermedad vascular periférica y la Diabetes Mellitus tipo 2. Por ello, la terapia antiplaquetaria es una herramienta básica en la prevención y tratamiento de la patología aterotrombótica (25).

El tratamiento con fármacos antiplaquetarios constituye la base del manejo clínico de los pacientes con estas patologías. Los beneficios de los fármacos antiagregantes en el tratamiento y en la prevención de enfermedades del sistema cardiovascular ponen de manifiesto la importancia de las plaquetas. Los fármacos antiagregantes empleados con mayor frecuencia en el tratamiento y la prevención de las complicaciones de las enfermedades cardiovasculares son la aspirina y el Clopidogrel, solos o en combinación (terapia dual) (9). También se cuenta con una nueva opción de tratamiento, que ha sido poco usado en nuestro país: el Prasugrel.

3.1.5 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES

Las células progenitoras endoteliales (EPCs) representan un grupo heterogéneo de células que se liberan de la médula ósea a la circulación y parecen contribuir en la reparación del endotelio dañado así como en la formación de nuevos vasos. El número y función de EPCs circulantes está influido por diferentes factores fisiológicos, patológicos y también por la acción de determinados fármacos y citocinas. A su vez, estas células tienen un papel crucial en las enfermedades cardiovasculares, tanto por su acción reparadora como por su valor pronóstico por lo que se han propuesto como biomarcadores y herramientas terapéuticas (Briasoulis A. y cols. 2011).

3.1.6 EL PAPEL DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (EPCs) EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

Durante mucho tiempo la inflamación autoinmune en pacientes con artritis reumatoide ha sido conocida por ser la principal causante de la destrucción del cartílago y el hueso observada en las articulaciones (Arshed A. 2006). El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el revestimiento de la articulación (membrana sinovial) es característica de esta respuesta inflamatoria y se observa en la patogénesis de la AR temprana (Gonzalez-Gay M. y cols. 2009).

El importante papel de la vasculogénesis y la participación de las células progenitoras endoteliales (EPCs) en los adultos fue descubierto tarde. Hasta hace poco se creía que la formación de nuevos vasos a largo de la vida estaba mediado exclusivamente por el surgimiento de células endoteliales completamente diferenciadas (EC) de vasos preexistentes, un proceso llamado angiogénesis. Este concepto fue refutado por primera vez por Asahara y cols en 1997. En un estudio de referencia, demostraron que los nuevos vasos sanguíneos también se pueden formar en los adultos por células progenitoras endoteliales circulantes, independientemente de las ya preexistentes. Ellos encontraron que los derivados de médula pueden adquirir las características de madurez, expresar marcadores endoteliales y participar en la reparación endotelial frente a procesos isquémicos (Asahara y cols. 1997).

La neovascularización sinovial es de fundamental importancia en la progresión de la AR mediante la creación de un conducto directo para la entrada en la articulación de los leucocitos que exacerban la inflamación circulante. La neovascularización se produce por

uno de dos mecanismos: la angiogénesis, la replicación y la reorganización de células endoteliales (ECs) preexistentes, o por la vasculogénesis y el reclutamiento de células progenitoras endoteliales (EPCs) que posteriormente se incorporen en los tejidos existentes y se diferencian en ECs funcionales maduras.

La evidencia creciente sugiere que las EPCs juegan un papel muy importante al contribuir a la homeostasis de la red vascular fisiológica, así como a la remodelación vascular sinovial en pacientes con AR (Isozaki y cols. 2013). Puesto que la disfunción endotelial es un mecanismo clave en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica, la mejoría de la disfunción endotelial contribuiría de manera favorable a la disminución de riesgo cardiovascular.

3.1.7 CUANTIFICACIÓN DE EPCs POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La citometría de flujo (CMF) se inició en la década de los 60 como un importante avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas, es un método de análisis celular multiparamétrico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al inferir en una fuente de luz (Hristov M. y cols. 2012). El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos lectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma

célula, una de las características más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares como el tamaño, la forma y la complejidad. Asahara y cols en 1997 fueron los primeros en identificar y aislar EPCs de la sangre periférica humana (Asahara y cols. 1997). Ellos demostraron que las EPCs podían diferenciarse de las ECs en base a proteínas que expresan en su superficie como CD34, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) y CD133 (AC133), un antígeno que identifica a células madre inmaduras. Estas observaciones sin duda dieron lugar a un cambio en el campo de la vasculogénesis, poniendo de relieve el papel de las EPCs en la reparación vascular por lo que diferentes grupos de estudio centraron su atención en ellas y en su identificación. Schmidt-Lucke y cols en 2010 realizaron una adaptación al protocolo de ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) para el recuento de las células madre hematopoyéticas que permite la comparación de los datos clínicos y de laboratorio, en el cual utilizan una combinación de anticuerpos monoclonales $CD45^{dim} + CD34 + KDR+$ para la identificación de EPCs (Schmidt-Lucke y cols 2010). En base a lo anterior el uso de la citometría de flujo para detectar EPCs se convirtió en el estándar de oro para su cuantificación e identificación, sin embargo hasta la fecha no existe un consenso acerca de que combinación de antígenos es la más adecuada para su identificación (Yoder MC 2011).

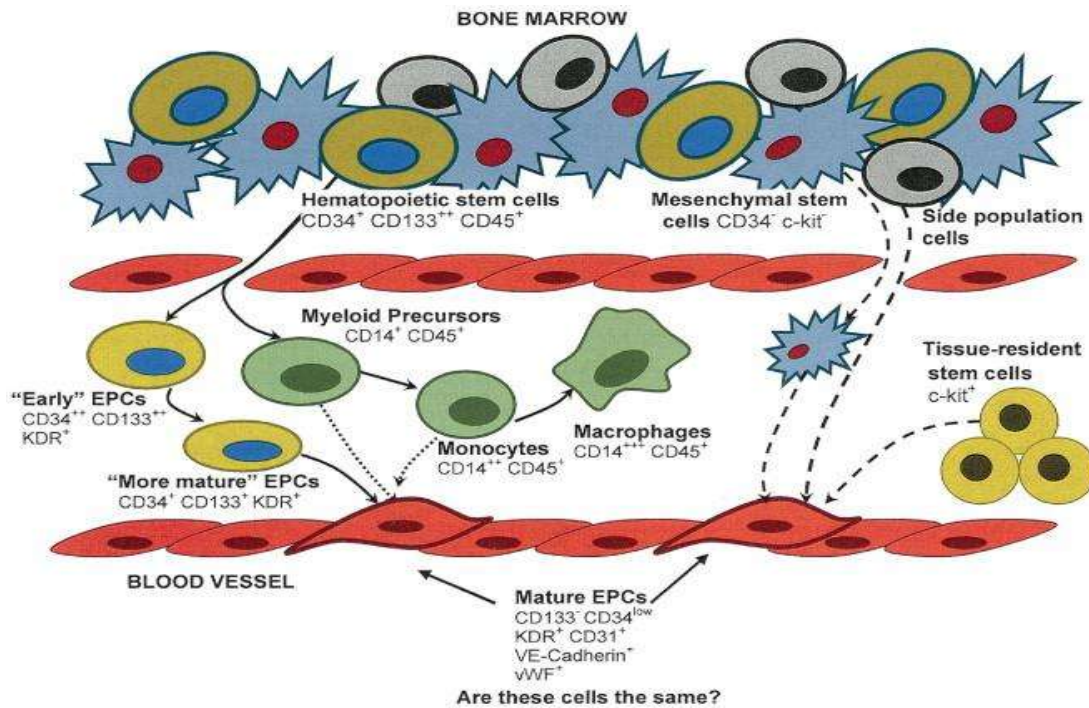


Figura 3. Estadios de maduración de las células progenitoras endoteliales.

4. JUSTIFICACIÓN.

Cada año, aproximadamente 37 millones de personas en el mundo sufren un evento cardiovascular y alrededor de 17 millones de personas mueren por dichas causas. Existen ciertos factores de riesgo que están muy relacionados con el desarrollo de enfermedad cardiovascular, entre los tradicionales se incluyen: hipertensión arterial, niveles elevados de lípidos en sangre, diabetes, obesidad y tabaquismo. Pero existen otros factores, tales como patologías asociadas que incrementan de manera muy importante el riesgo cardiovascular y que en muchas ocasiones son pasadas por alto. La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que involucra un proceso inflamatorio crónico generalizado, el cual facilita la disfunción endotelial, por lo que presenta riesgo incrementado para Enfermedad Cardiovascular. Los pacientes con AR presentan además una aterosclerosis acelerada. El padecimiento es un proceso degenerativo que puede provocar incapacidad permanente y disminuir hasta en 10 años la expectativa de vida de las personas.

Se ha documentado que la mortalidad en pacientes con AR es mayor que en la población general (24.4 vs 18.9 muertes por 1,000 pacientes por año). De acuerdo a más de 15 series de la literatura, la mortalidad tiene una relación con la población que no tiene AR de 1.28 a 2.98. Su esperanza de vida disminuye de 3 hasta 10 años, principalmente por eventos cardiovasculares fatales.

El riesgo cardiovascular puede estratificarse haciendo uso de factores de riesgo tradicionales como lo son la edad, género, tabaquismo, actividad física, dislipidemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus, así como por la determinación de factores de riesgo considerados no tradicionales como biomarcadores inflamatorios y protrombóticos (IL-6, TNF, hs-PCR, adiponectina, sCD40L, PAI-1, vWF y p-Selectina). Aunado a estos biomarcadores, diversos estudios han demostrado que las células progenitoras endoteliales contribuyen en la reparación del endotelio dañado así como en la formación de nuevos vasos, el número y función de estas células circulantes está influido por diferentes factores fisiológicos, patológicos y también por la acción de determinados fármacos y citocinas. A su vez, estas células tienen un papel crucial en las enfermedades cardiovasculares, tanto por su acción reparadora como por su valor pronóstico por lo que se han propuesto como biomarcadores y herramientas terapéuticas.

Basado en lo anterior, el presente estudio pretende determinar la correlación entre los niveles de Células Progenitoras Endoteliales con el grado de disfunción endotelial en pacientes con Artritis Reumatoide y compararlos con controles sanos con la finalidad de contribuir a disminuir el riesgo cardiovascular que conlleva la fisiopatología de la AR.

5. HIPÓTESIS.

Los pacientes con artritis reumatoide (AR) que presentan disfunción endotelial presentaran una disminución en la cantidad de células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs).

6. OBJETIVOS.

6.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la correlación entre los niveles de Células Progenitoras Endoteliales con el grado de disfunción endotelial en pacientes con Artritis Reumatoide y compararlos con controles sanos.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar la presencia de factores de riesgo cardiovascular y su relación con la actividad clínica de pacientes con AR.
- Determinar la asociación que existe entre el los niveles de EPCs y biomarcadores protrombóticos (p-Selectina) y de inflamación (IL-6, TNF α).
- Correlacionar los estados de disfunción endotelial y estado protrombótico de pacientes con AR con los datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.

7. CRITERIOS.

7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Pacientes de 18 a 70 años de edad.
- Pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide

7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Pacientes en Pacientes con enfermedades autoinmunes agregadas
- Pacientes con diagnóstico clínico de DM
- Pacientes con ECV documentada.
- Pacientes que se encuentren recibiendo terapia con estatinas

7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

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

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 SITIO DE ESTUDIO.

Servicio de Reumatología del HGR No. 1 del IMSS en la ciudad de Morelia y 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

8.2 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de cohorte, casos y controles, comparativo, prolectivo, transversal.

8.3 SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

Pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide que acudan a consulta programada al servicio de Reumatología del HGR No. 1 del IMSS.

Todos los pacientes incluidos firmaron una carta de consentimiento informado antes de realizarse el procedimiento.

8.4 TOMA DE MUESTRA.

El estudio se realizará en coordinación con la consulta externa del Servicio de Reumatología y el laboratorio del HGR No. 1 IMSS. Los pacientes que cumplan con los

criterios de inclusión, se les invitará a participar, después de aceptar la invitación y firmar consentimiento informado. En todos los participantes se realizará: Historia clínica: Con énfasis en el interrogatorio de factores de riesgo cardiovascular y la medición de presión arterial, peso, talla, índice de masa corporal, circunferencia abdominal. Se realizará toma de muestra de sangre periférica mediante venopunción de antebrazo con sistema vacutainer de recolección al vacío, se obtendrá suero y plasma por centrifugación para realizar: Biometría Hemática, Velocidad de Sedimentación Globular, Proteína C reactiva y PCC, en el laboratorio del HGR No. 1 del IMSS Se realizará cuantificación de células progenitoras endoteliales utilizando el citómetro de flujo FacsCalibur de la marca Becton Dickinson del laboratorio del HGR No. 1 del IMSS. Se teñirán 750,000 células de sangre periférica con los anticuerpos monoclonales específicos CD45, CD34 y KDR durante 30 minutos a temperatura ambiente , se lavarán 2 veces con PBS, centrifugándose posteriormente a 1000 rpm durante 5 minutos, se lisarán los eritocitos con cloruro de amonio incubándolos a 4 °C por 15 minutos, posteriormente se lavarán 2 veces con PBS y nuevamente se centrifugará a 1000rpm durante 5 minutos, el botón celular se re suspenderá en 1 mL de PBS al 1% de paraformaldehído, la muestra se adquirirá en el citómetro de flujo y se cuantificará el porcentaje de células positivas con el software Cell Quest Pro.

8.5 METODOLOGÍA

Para la evaluación del estado de fosforilación del VASP, se utilizó como muestra la sangre total y un kit estandarizado de citometría de flujo para análisis de plaquetas. La muestra recolectada previamente en un tubo con citrato de sodio para la obtención de sangre total fue incubada en un primer tubo de polipropileno con prostaglandina E1 (PGE1) y en un segundo y tercer tubo con PGE1 y adenosin difosfato de sodio (ADP) por 10 minutos con agitación y fijada con paraformaldehído, posteriormente las plaquetas fueron permeabilizadas con un detergente no iónico. Posteriormente se incorporó el anticuerpo monoclonal primario dirigido contra el VASP, seguido de un anticuerpo secundario anti-VASP conjugado con isotiocianato de fluoresceína, y finalmente el anticuerpo de detección plaquetaria dirigido contra el CD61 marcado con ficoeritrina (anti-CD 61 PE). La duración total de la preparación no excede los 30 minutos. El índice de reactividad plaquetaria (IRP) fue calculado a través del índice de fluoresceína media (IMF) de las muestras incubadas con PGE1 y PGE1 + ADP, de acuerdo con la fórmula para la obtención del índice de reactividad plaquetaria.

8.6 PREPARACION DE LOS TUBOS Y DE LA MUESTRA

Sobre una gradilla y por cada muestra colocar 3 tubos de plástico marcados como T1 (Tubo 1), T2 (Tubo 2) y T3 (Tubo 3).

Tabla 3. Preparación de los tubos y de la muestra para análisis por citometría de flujo

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
5 µl de sangre total	5 µl de sangre total	5 µl de sangre total

5 µl de reactivo 2a (PGE1)	5 µl de reactivo 2b (PGE1 + ADP)	5 µl de reactivo 2b (PGE1 + ADP)
Homogeneizar durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex ajustado a velocidad lenta.		
Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.		
FIJACION (Formaldehído al 3%)		
5 µl de reactivo 3	5 µl de reactivo 3	5 µl de reactivo 3
Homogeneizar durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex ajustado a velocidad lenta.		
Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.		
PERMEABILIZACIÓN CELULAR E INMUNOMARCAJE (Anticuerpo monoclonal anti VASP + permeabilizante)		
5 µl de reactivo 4a	5 µl de reactivo 4a	5 µl de reactivo 4b
Homogeneizar durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex ajustado a velocidad lenta.		
Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad		
MARCAJE FLUORESCENTE Y DETECCIÓN PLAQUETARIA (Anticuerpo secundario policlonal anti-IgG re ratón marcado con FICT)		
5 µl de reactivo 5	5 µl de reactivo 5	5 µl de reactivo 5
Homogeneizar durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex ajustado a velocidad lenta.		
Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad		
2 ml de reactivo 1	2 ml de reactivo 1	2 ml de reactivo 1
Colocar inmediatamente los tubos a 2-8º C hasta el momento de la adquisición en el Citómetro.		
Nota: Como en todos los reactivos el volumen utilizado es mínimo (5µl), se recomienda dispensarlos en el fondo de los tubos.		

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente al llevar a cabo el protocolo.

8.7 ANALISIS. ADQUISICIÓN DE EPCs POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Las muestras se analizaron en el Citometro de flujo FACS Altra (Beckman Coulter), con el programa Expo 3, antes de cualquier lectura se realizo la calibración del equipo con las perlas calibradoras (Flow-Check, cat. No. Beckman-Coulter Inc. Fullerton CA.) que contienen los fluorocromos FITC, PE, ECD, PC5. La adquisición de las plaquetas se realizo de acuerdo a sus características de dispersión de luz frontal (FSC, tamaño) y de luz lateral (SSC, complejidad), considerando estos parámetros en escalas logarítmicas por el tamaño de las plaquetas (2-4 micras)

9. ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizó una descripción de las características generales de la población mediante estadística descriptiva para variables cualitativas con proporciones y para variables cuantitativas mediante promedios con sus correspondientes intervalos de confianza para el 95%.

Las variables se presentan en forma de media \pm desviación estándar y recuentos (porcentajes). Se utilizo la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución

normal de los datos de las variables continuas. Las variables continuas se compararon con la prueba de la T de Student. U de Mann Whitney para pruebas independientes.

Los coeficientes de correlación se obtuvieron mediante la prueba de Spearman con significancia bilateral.

Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para comparaciones múltiples tanto intra e intergrupo de los niveles de biomarcadores celulares y plasmáticos. Se considerará significativo un valor de $p < 0.05$ sin ajuste para comparaciones múltiples. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos).

10. ASPECTOS ETICOS.

Este proyecto se apegará estrictamente a la normatividad vigente por la Secretaría de Salud para los estudios en humanos. Se realizará una carta de consentimiento informado la cual será presentada a cada uno de los pacientes participantes en el proyecto para su respectiva firma, en ella se enfatizará la naturaleza del estudio, su carácter voluntario, los investigadores responsables, la ausencia de riesgos para su salud, los beneficios esperados, la manera como se pretende cuidar su integridad, la naturaleza confidencial de los datos y la salida voluntaria en caso de que así se desee. A los pacientes que en alguna de las pruebas se detecte como anormal se le informará y orientará para que tenga

asesoría médica especializada y complete su estudio y de ser necesario, la modificación de su tratamiento.

11. RESULTADOS

En el estudio participaron un total de 30 pacientes con Artritis Reumatoide (AR) y 20 voluntarios sanos pareados por edad y genero. Del total de pacientes con AR, 95.0% pertenecían 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 $\pm 10,93$ con una mínima de 26 años y máxima de 62 años. En la tabla 6 se muestran las diversas características clínicas de los pacientes.

Tabla 4. Características demográficas y clínicas de la población de estudio.

Edad	(años)	60.5 \pm 11.18
Hombres	(%)	86.6
Mujeres	(%)	13.4
Historial familiar	(%)	50
IMC	(kg/m ²)	27.2789
Tabaquismo	(%)	56.7
Dislipidemia	(%)	46.7
Hipertensión arterial	(%)	60
Diabetes mellitus	(%)	43.3

ACTP	(%)	58.3
Angiografía diagnóstica	(%)	38.9
Plaquetas	(10 ³ /dL)	206.29 ± 57.53
Hematocrito	(%)	42.07 ± 5.91
VPM	(fL)	9.37 ± 2.04

Datos expresados en media ± desviación estándar o n (%). VPM (Volumen plaquetario medio)

Se encontró una media de los valores del Índice de reactividad plaquetaria (IRP) en la toma post carga de 61.28 ± 22.83 y de 165.56 ± 89.20 para las Unidades de reacción P2Y₁₂ (PRU). Se realizó un análisis de correlación entre las variables IRP-VASP y PRU-INHIBICION de acuerdo a la prueba de Pearson en el cual se encontró una correlación entre IRP-PRU de 0.774, PRU-INHIBICION de -0.899, IRP-INHIBICION -0.732. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 5 Correlación de Pearson para las variables cuantitativas EPCs vs DAS28

		IRP	PRU	INHIBICION
IRP	Correlación de Pearson	1	.774**	-.732**
	N	30	30	30
PRU	Correlación de Pearson	.774**	1	-.899**
	N	30	30	30
INHIBICION	Correlación de Pearson	-.732**	-.899**	1
	N	30	30	30

***.* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral). IRP: Índice de reactividad plaquetaria, PRU: Unidades de reacción P2Y₁₂.

Se evaluó el comportamiento de las variables mediante un análisis de regresión lineal simple con un intervalo de confianza del 95%, se ajustó el modelo mediante el coeficiente de correlación múltiple (R), en un grafico de dispersión, se obtuvo un valor de R de 0.774 al comparar las variables IRP-PRU en una correlación positiva y un valor de 0.899 al comparar las variables INHIBICIÓN-PRU en una correlación negativa.

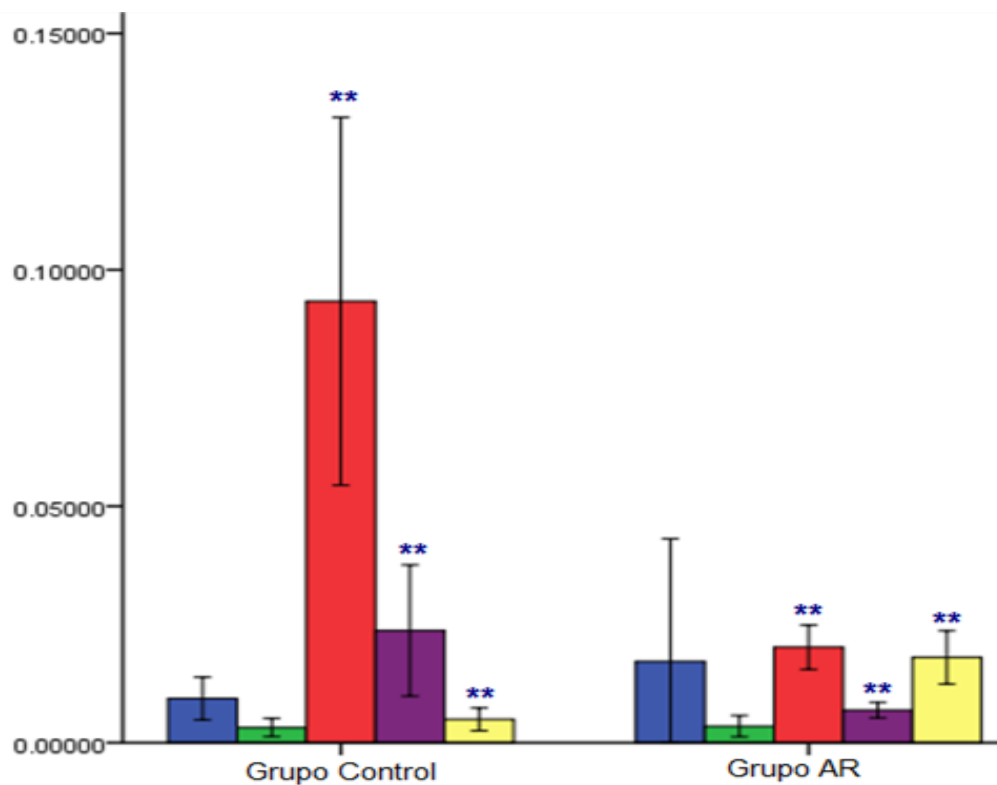


Fig. 4 Comparación EPCs (early, CD34+, CD45+, CD133+, KDR+, late) EPCs maduras en Grupo Control vs Grupo AR. Se observan diferencias significativas en las poblaciones de lateEPCs y EC.

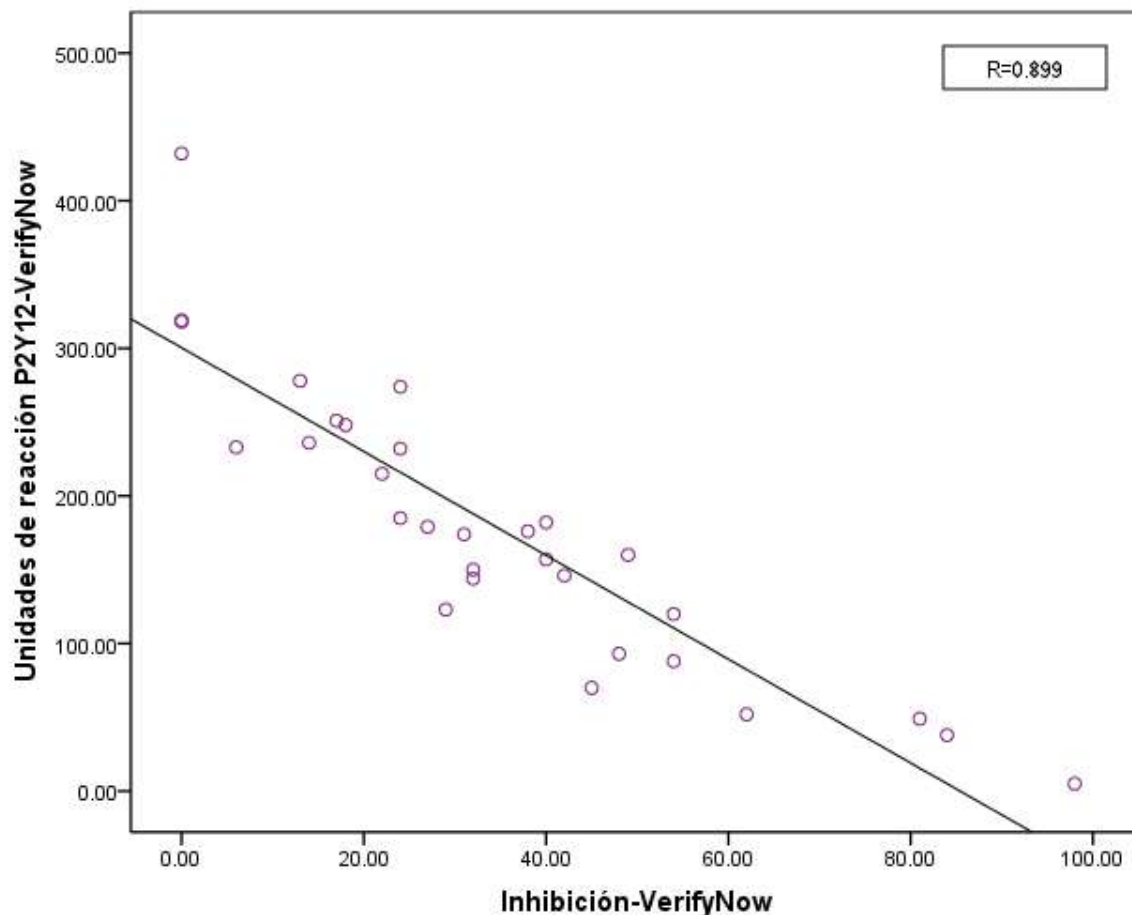


Fig. 5 Grafico de dispersión PRU vs Inhibición.

Se observa una relación lineal negativa entre las variables PRU e Inhibición, así como un coeficiente de correlación (R) de 0.899

Se determinó el efecto antiplaquetario del Clopidogrel por citometría de flujo mediante la persistencia de VASP fosforilado evaluando el índice de reactividad plaquetaria (IRP) post carga (n= 30) y a las 24 horas (n= 16) de su administración.

Tabla 6. Estadísticos descriptivos IRP toma post carga y 24 horas

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
IRP(TPC)	30	72.31	20.00	92.31	61.2863	22.83384
IRP(T24)	16	64.62	20.00	84.62	59.9413	16.74408
IRP (TPC)	16	72.31	20.00	92.31	54.6393	21.36943

**IRP: Índice de reactividad plaquetaria, PRU: Unidades de reacción P2Y₁₂, TPC: Toma post carga, T24: Toma 24 horas*

Para poder llevar a cabo una evaluación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la comparación de las medias del índice de reactividad plaquetaria (IRP) toma post carga y toma 24 horas se tomaron en cuenta únicamente a los pacientes en los que fue posible obtener ambas muestras (n= 16) se obtuvo una media del IRP toma post carga (TPC) de 54.63 ± 21.36 y de 59.94 ± 16.74 para la toma de 24 horas. Se realizó una prueba T para variables relacionadas, la diferencia no fue significativa ($p= 0.445$)

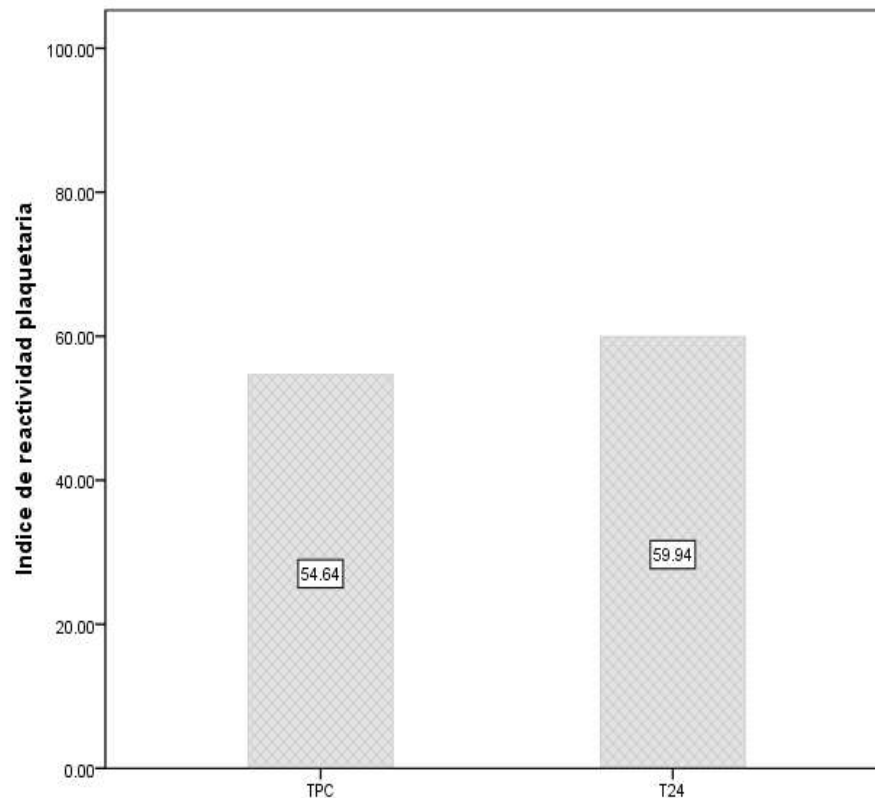


Fig. 6 Determinación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la evaluación del IRP toma post carga a las 24 horas de su administración.

Se determinó el efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante el uso del dispositivo de uso inmediato VerifyNow, se evaluaron las unidades de reacción P2Y₁₂ post carga (n= 30) y a las 24 horas (n= 14) de su administración.

Para poder llevar a cabo la comparación de medias de la unidades de reacción P2Y₁₂ (PRU) al igual que con el IRP se tomaron únicamente los datos de los pacientes que tenían los dos resultados (n=14), se obtuvo una media de PRU toma post carga (TPC) de 207.2149 ± 111.6830 y 139.4286 ± 66.41792 para la toma de 24 horas. Se realizó una prueba T para variables relacionadas, se obtuvo un valor de $p= 0.036$.

Tabla 7. Estadísticos descriptivos PRU toma post carga y toma 24 horas

	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PRU (TPC)	30	427.00	5.00	432.00	177.5667	92.29435
PRU(T24)	14	207.00	41.00	248.00	139.4286	66.41792
PRU (TPC)	14	394.00	38.00	432.00	207.2143	111.6830

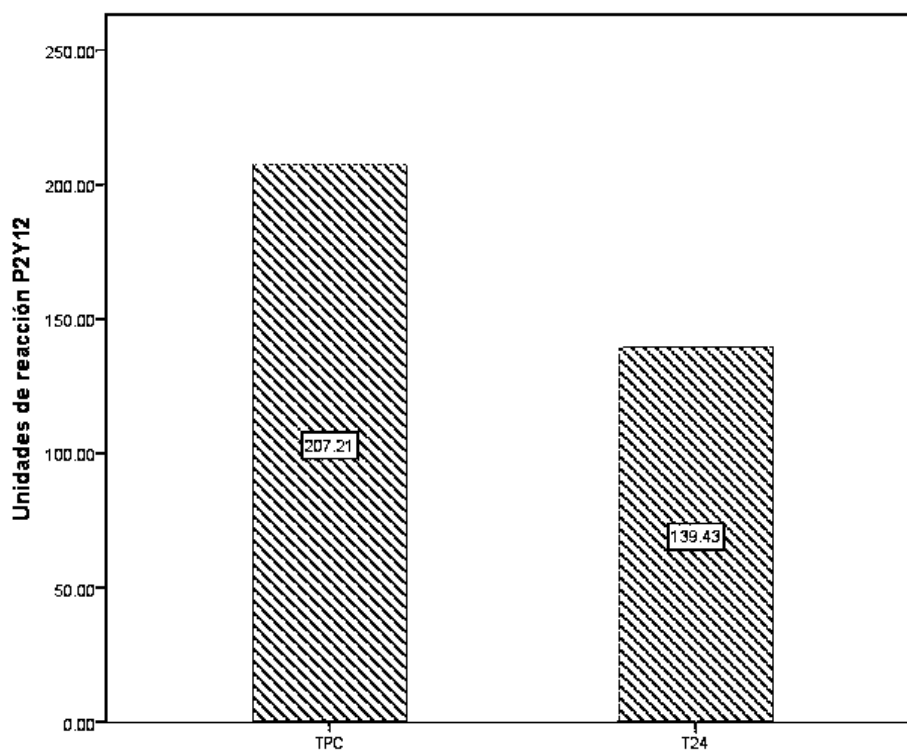


Figura 7. Determinación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la evaluación del PRU toma post carga a las 24 horas de su administración.

Se llevo a cabo una correlación de los estados del IRP y PRU toma post carga y toma 24 horas con los datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en el estudio. Se analizaron mediante un análisis T para muestras dependientes e independientes. Se observó un IRP y PRU muy homogéneo para ambas tomas (TPC y T24) por lo que no se encontró una diferencia significativa al comparar las variables por género.

Tabla 8. Comparación del IRP, PRU TPC y del IRP, PRU T24 de acuerdo al genero

		N	Media	Desviación estándar	Significancia bilateral
IRP (TPC)	HOMBRE	24	62.9875	22.61093	0.424
	MUJER	6	54.4817	24.55209	0.465
PRU (TPC)	HOMBRE	24	180.2083	98.23485	0.767
	MUJER	6	167.0000	90.06664	0.760
IRP (T24)	HOMBRE	13	61.1669	18.40587	0.561
	MUJER	3	54.6300	4.24216	0.268
PRU (T24)	HOMBRE	11	141.5455	67.87395	0.830
	MUJER	3	131.6667	74.32586	0.849

*IRP: Índice de reactividad plaquetaria, PRU: Unidades de reacción P2Y₁₂, TPC: Toma post carga

Se realizó una comparación de los datos clínicos con el IRP, PRU TPC y T24 horas después de la administración del Clopidogrel, se encontraron algunas diferencias significativas las cuales se muestran en las tablas 11 y 12.

Tabla 9. Correlación del IRP y PRU toma post carga con los datos clínicos y demográficos de la población de estudio

		N	Media	Desviación estándar	Significancia bilateral
Historial familiar IRP TPC	NO	15	60.0460	24.74597	0.772
	SI	15	62.5267	21.5488	0.772
Historial familiar PRU TPC	NO	15	185.6667	113.20504	0.650
	SI	15	152.1333	62.72487	0.650
Tabaquismo IRP TPC	NO	13	61.4069	23.73498	0.980
	SI	17	61.1941	22.85774	0.980
Tabaquismo PRU TPC	NO	13	190.8462	107.08318	0.514
	SI	17	167.4118	87.21458	0.527
Dislipidemia IRP TPC	NO	13	51.3408	21.97711	0.034
	SI	17	68.8918	20.99853	0.036
Dislipidemia PRU TPC	NO	13	150.0000	79.33368	0.170
	SI	17	198.6471	103.19577	0.155
HA IRP TPC	NO	12	62.2983	24.14483	0.847
	SI	18	60.6117	22.60525	0.849
HA PRU TPC	NO	12	184.0000	107.22703	0.769
	SI	18	173.2778	89.45837	0.778
DM IRP TPC	NO	17	55.4547	21.67284	0.111
	SI	13	68.9123	22.85935	0.115
DM PRU TPC	NO	17	149.9412	80.53840	0.068
	SI	13	213.6923	103.93378	0.081

*IRP: Índice de reactividad plaquetaria, PRU: Unidades de reacción P2Y₁₂, TPC: Toma post carga, HA: Hipertensión arterial, DM: Diabetes Mellitus.

Tabla 10. Correlación del IRP y PRU toma 24 horas con los datos clínicos y demográficos de la población de estudio

		N	Media	Desviación estándar	Significancia bilateral
Historial familiar IRP T24	NO	6	62.1600	14.08332	0.696
	SI	10	58.6100	18.75724	0.674
Historial familiar PRU T24	NO	9	166.2222	55.67939	0.037
	SI	5	91.2000	60.11406	0.051
Tabaquismo IRP T24	NO	5	65.2300	13.07550	0.413
	SI	11	57.5373	18.21583	0.359
Tabaquismo PRU T24	NO	8	125.1250	64.30827	0.373
	SI	6	158.5000	70.11348	0.382
Dislipidemia IRP T24	NO	7	57.3829	22.78311	0.607
	SI	9	61.9311	11.23383	0.641
Dislipidemia PRU T24	NO	6	161.0000	69.21849	0.311
	SI	8	123.2500	63.81390	0.320
HA IRP T24	NO	5	43.4120	13.14948	0.003
	SI	11	67.4545	12.35639	0.010
HA PRU T24	NO	7	141.2857	70.90067	0.992
	SI	7	137.5714	67.25290	0.992
DM IRP T24	NO	8	54.5200	18.77687	0.206
	SI	8	65.3625	13.45484	0.208
DM PRU T24	NO	9	131.5556	70.34044	0.573
	SI	5	153.6000	63.64590	0.564

*IRP: Índice de reactividad plaquetaria, PRU: Unidades de reacción P2Y₁₂, T24: Toma 24 horas, HA: Hipertensión arterial, DM: Diabetes Mellitus.

Tabla 11. Comparación de los datos de laboratorio contra IRP y PRU TPC

	Media	Desviación estándar.	N
VPM	9.3754	2.04115	
IRP	62.1464	22.93484	30
Plaquetas	206.2929	57.53223	
IRP	62.1464	22.93484	30
Hematocrito	42.0746	5.91485	
IRP	62.1464	22.93484	30
VPM	9.3754	2.04115	
PRU	176.9643	98.41615	30
Plaquetas	206.2929	57.53223	
PRU	176.9643	98.41615	30
Hematocrito	42.0746	5.91485	
PRU	176.9643	98.41615	30

* VPM: Volumen plaquetario medio, IRP: Índice de reactividad plaquetaria, PRU: Unidades de reacción P2Y₁₂

Se identifico a los pacientes con buena respuesta y con baja respuesta a la dosis de carga de 600 mg del antiplaquetario Clopidogrel por citometría def lujo mediante la persistencia de VASP fosforilado. Se clasifico a los pacientes de acuerdo al porcentaje de IRP mediante una distribución individual en cuartiles la cual se muestra en la tabla 14. Se realizó también una clasificación tomando un punto de corte del IRP del 69%.

Tabla 12. Distribución individual en cuartiles de la respuesta a Clopidogrel mediante el IRP TPC medido por VASP

	% IRP	N	Porcentaje	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
IRP	0-25%	2	6.7	20.00	25.00	22.5000	3.53553
IRP	26-50%	10	33.3%	30.00	50.00	40.6610	8.55313
IRP	51-75%	8	26.7%	57.14	75.00	64.6525	6.67979
IRP	76-100%	10	33.3%	80.00	92.31	86.9760	4.51985
Total		30	100.0%				

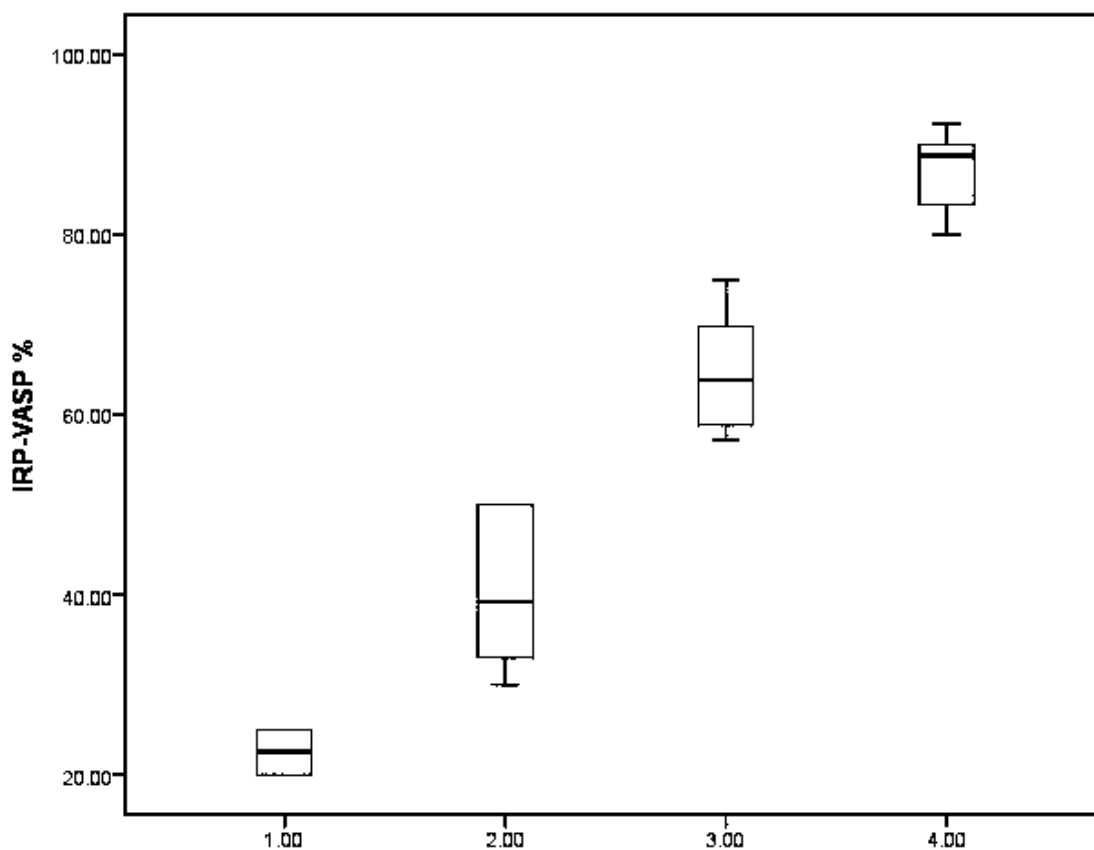


Figura 8. Distribución y variabilidad individual de índice de reactividad plaquetaria (IRP) medido por VASP en cuartiles.

Tabla 13. Distribución individual de la respuesta a Clopidogrel con un punto de corte del IRP-VASP TPC de 69%

	% IRP	N	Porcentaje	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
IRP	0-25%	2	6.7%	20.00	25.00	22.5000	3.53553
IRP	26-50%	10	33.3%	30.00	50.00	40.6610	8.55313
IRP	51-68%	6	20.0%	57.14	66.67	61.5367	3.93281
IRP	69-100%	12	40.0%	73.00	92.31	84.8133	6.51215
Total		30	100.0				

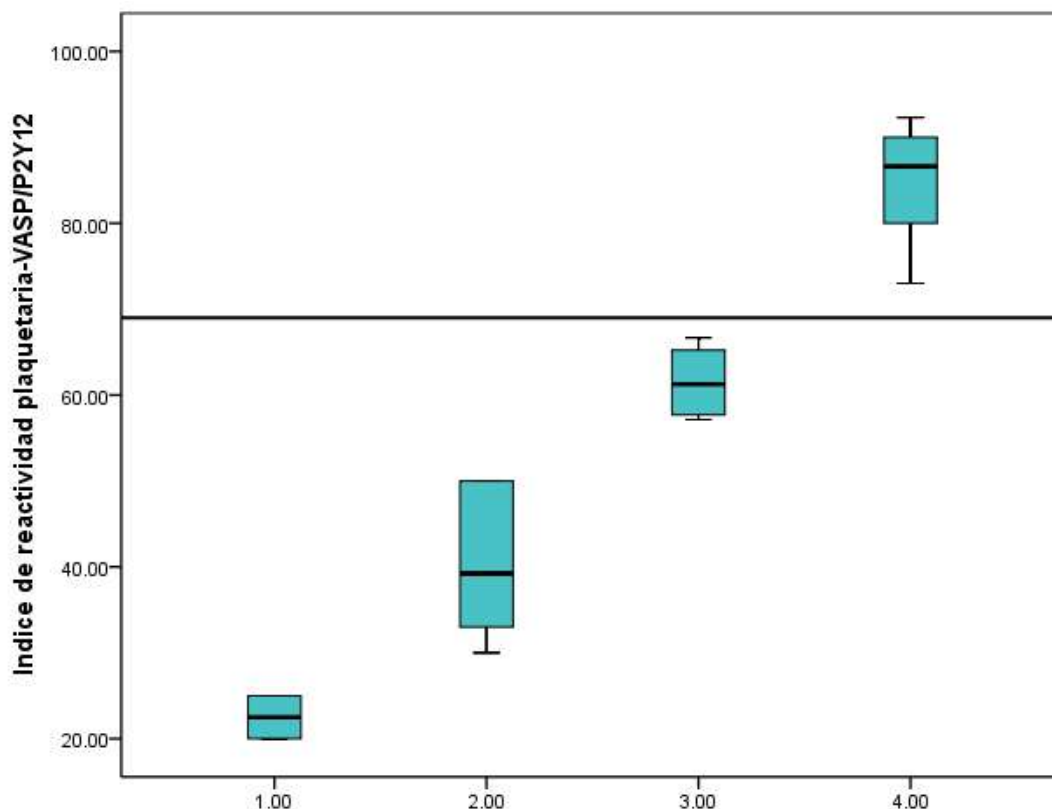


Figura 9 Distribución y variabilidad individual de índice de reactividad plaquetaria (IRP) medido por VASP con un punto de corte del 69%.

También se identifico a los pacientes con buena respuesta y con baja respuesta a la dosis de carga de 600 mg del antiplaquetario Clopidogrel mediante el uso del dispositivo de uso inmediato VerifyNow. Se clasifico a los pacientes de acuerdo al porcentaje de PRU tomando un punto de corte de >230 PRU para identificar a los pacientes no respondedores a la terapia con el antiplaquetario. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 14. Distribución individual de la respuesta a Clopidogrel en unidades de reacción P2Y12 (PRU) medido por VerifyNow

	Punto de corte	N	Porcentaje	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
PRU	<230	20	66.70	5.00	215.00	125.300	58.51774
PRU	>230	10	33.30	232.00	432.00	282.100	61.80516
Total		30	100.0				

Por ultimo se realizo un grafico de dispersión simple en el que se muestran de color rojo a aquellos pacientes que mostraron un PRU >230 los cuales fueron clasificados como pacientes con buena respuesta a la terapia con Clopidogrel, en azul se muestran a aquellos pacientes con un PRU <230 los cuales fueron clasificados como «no respondedores» al antiplaquetario.

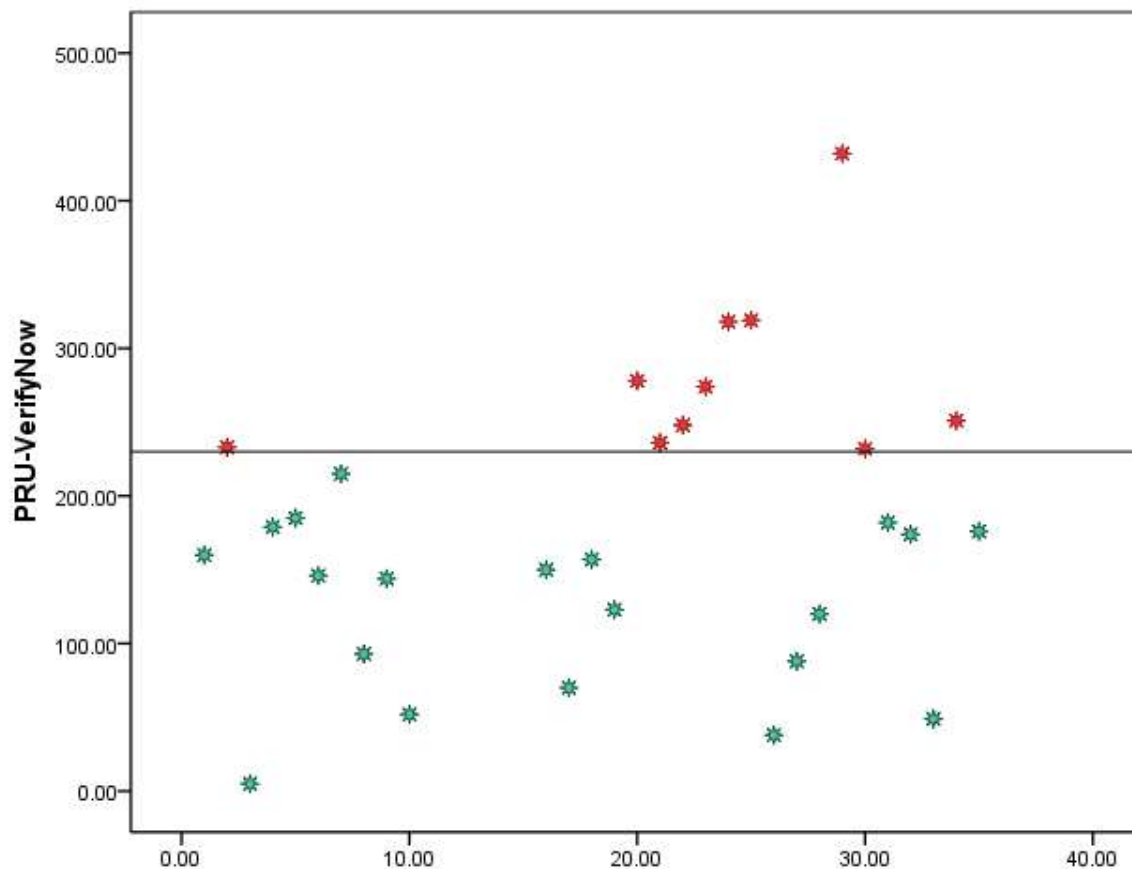


Figura 10 Distribución y variabilidad individual de las Unidades de reacción P2Y12 medido por VerifyNow Utilizando un punto de corte de >230 para pacientes «no respondedores» al tratamiento con Clopidogrel.

12. DISCUSION.

La terapia antiplaquetaria es la piedra angular del tratamiento en la prevención de eventos isquémicos en pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC), en particular en el contexto de los síndromes coronarios agudos e intervenciones coronarias percutáneas (ICP). Sin embargo, el tratamiento antiplaquetario también se asocia con un mayor riesgo de complicaciones hemorrágicas, que son más frecuentes con el uso de regímenes más potentes de tratamientos antiplaquetarios. Por lo tanto, definir el equilibrio entre el riesgo de eventos trombóticos y el riesgo de sangrado es esencial para mejorar los resultados clínicos generales. Los efectos de los agentes antiplaquetarios y su farmacodinamia varían ampliamente y pueden estar asociados con diferencias en los resultados (38).

Actualmente múltiples ensayos de la función plaquetaria están disponibles para evaluar los efectos farmacodinámicos de uso común los agentes antiplaquetarios, sin embargo aun no hay consenso con respecto al método más adecuado para cuantificar la magnitud de la reactividad plaquetaria en pacientes sometidos a un tratamiento antiplaquetario (36,37). El análisis VASP medido por citometría de flujo ha demostrado ser una técnica de alta sensibilidad para la evaluación de la reactividad plaquetaria en pacientes sometidos a tratamiento con Clopidogrel, algunas de las ventajas de esta técnica son que se utiliza sangre total, requiere un volumen de muestra muy pequeño, y ha demostrado tener una buena correlación con la agregometría, sin embargo como se menciona anteriormente se trata de un estudio costoso, que depende de un citómetro de flujo y por lo tanto que requiere a personal especializado. Por otro lado el sistema VerifyNow es una prueba simple y rápida que también ha demostrado tener una buena correlación con la agregometría, ambas técnicas se han estudiado por separado en diversos estudios, sin embargo son pocos los que han hecho una correlación VASP-VerifyNow (47, 50, 14, 52)

El objetivo principal del estudio fue determinar la correlación entre dos diferentes metodologías, la de análisis VASP por citometría de flujo y la del dispositivo de uso inmediato VerifyNow. Se llevó a cabo un análisis de los resultados obtenidos, la correlación (Pearson) entre ambas pruebas fue altamente significativa, se obtuvo un valor de $R= 0.774$ entre el índice de reactividad plaquetaria (IRP) y las unidades de reacción $P2Y_{12}$ (PRU), este resultado aporta información relevante en el ámbito clínico ya que el dispositivo VerifyNow es una prueba que permite estudiar la función plaquetaria a pie de cama, este alto grado de correlación proporciona una nueva alternativa, adecuada para poder guiar la terapia antiplaquetaria y poder definir un pronóstico de manera rápida y sencilla. Sin embargo con lo anterior no pretendemos sustituir la técnica de VASP por citometría de flujo, la cual ha demostrado ser capaz de medir de manera individual la inhibición del receptor $P2Y_{12}$, además de ser considerada la técnica más confiable en la monitorización de pacientes resistentes al tratamiento con Clopidogrel.

El Clopidogrel presenta una gran variabilidad interindividual de respuesta, uno de los principales mecanismos implicados en su eficacia limitada, El concepto de «variabilidad de respuesta al clopidogrel» ha derivado en la preocupación de que algunos pacientes pueden no estar adecuadamente protegidos de la activación y la agregación de plaquetas y, por lo tanto, están expuestos a mayor riesgo de evento trombótico (28). Barragán et al. (31) fueron los primeros en demostrar una asociación entre la reactividad plaquetaria post-tratamiento y la aparición de eventos trombóticos en un estudio caso-control de pacientes con ICP mediante el análisis VASP/ $P2Y_{12}$.

Es importante destacar que diferentes los estudios han utilizado el análisis de la curva ROC para definir un umbral o punto de corte de la reactividad plaquetaria asociada con el tratamiento de la combinación óptima de sensibilidad y especificidad para identificar el riesgo trombótico, la identificación de un punto de corte fiable permite a los médicos a

distinguir a los pacientes con alta reactividad plaquetaria de aquellos con una baja reactividad, cabe señalar que dichos puntos de corte son motivo de una amplia controversia ya que estos podrían depender del subgrupo de pacientes estudiados, el lugar y el perfil del paciente.

Hasta la fecha, los valores de corte se han investigado sobre todo en pacientes sometidos a ICP, de acuerdo a lo anterior el IRP medido por VASP/P2Y₁₂ es una medida del porcentaje de la reactividad plaquetaria la cual es inversamente proporcional a la eficacia del Clopidogrel, es decir a mayores porcentajes de IRP menor efectividad del fármaco.

En el estudio realizado en 2003 por Barragán (31) un índice de reactividad plaquetaria >50% medido por el ensayo de VASP se asoció con riesgo de trombosis. En 2007 Bonello y colaboradores retoman este punto de corte, clasifican como buena respuesta al Clopidogrel a los pacientes con un IRP < 50 % y como «no respondedores» a los pacientes con un IRP >50% (35), sin embargo al realizar una comparación del análisis VASP/P2Y₁₂ con la agregometría plaquetaria se observó que los pacientes que fueron definidos como «no respondedores» al Clopidogrel mediante al análisis VASP/P2Y₁₂ de acuerdo al punto de corte del IRP >50%, podían estar clasificados como pacientes con alta reactividad plaquetaria en tratamiento (ARPET) mediante la agregometría plaquetaria, es decir pacientes que muestran una respuesta deficiente a la terapia con Clopidogrel, pero sin embargo de alguna manera responden al tratamiento.

Matetzky y cols. en 2004 optaron por estratificar a la población de estudio en cuartiles, en la que los pacientes del último cuartil fueron clasificados como pacientes «no respondedores» al Clopidogrel.

Por otro lado Aleil y cols. en 2005 (61) evaluaron el IRP en tres grupos, pacientes sanos, pacientes con enfermedad cardiovascular isquémica sin tratamiento con Clopidogrel y pacientes con enfermedad cardiovascular isquémica en tratamiento con Clopidogrel, ellos

clasificaron a los dos primeros grupos como «no respondedores» al Clopidogrel al no encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.

Los puntos de corte mas estrictos respecto a la buena respuesta al Clopidogrel son los establecidos por Guillaume Cayla y colaboradores en 2008 quienes al igual que Aleil y cols dividieron a los grupos de estudio en cuartiles y determinaron que el mejor punto de corte para predecir eventos adversos en pacientes con Síndrome Coronario Agudo (SCA) fue un IRP >70% (54), Siller-Matula en 2008 propone un punto de corte del IRP >69 % (56) para la identificación de «no respondedores» al Clopidogrel y retoma este punto de corte en 2012 en uno de sus estudios mas recientes (55).

Con base en lo anterior, para la clasificación de nuestra población de estudio decidimos tomar el punto de corte del 69%, con la finalidad de evitar una clasificación errónea de aquellos pacientes que presentan una baja respuesta a la terapia con Clopidogrel y debido a que dicho punto de corte cuenta con un mayor respaldo en la literatura.

El sistema VerifyNow/P2Y₁₂ a diferencia del análisis VASP/P2Y₁₂ maneja puntos de corte menos controversiales, diversos estudios se han realizado para identificar el punto de corte con la mejor especificidad y sensibilidad, el primer estudio clínico en esta dirección fue dirigido por Price y colaboradores en 2008 (58) en el que encontraron que un valor de PRU >235 esta asociado con eventos adversos subsecuentes a la ICP, Patti y cols (59) en el mismo año y Marcucci y colaboradores (60) en 2009 proponen un punto de corte ≥ 240 para la identificación de pacientes con mayor riesgo de eventos adversos posteriores a la ICP, mas recientemente en 2010 Breet y colaboradores toman un punto de corte de >236 PRU y Gremmel y cols. en 2011 retoman el establecido por Price en 2008, este ultimo y colaboradores en este mismo año deciden tomar un nuevo punto de corte PRU ≥ 230 para la identificación de pacientes no respondedores a la terapia con Clopidogrel, los últimos estudios realizados en 2012 por Codner P. y cols y Haraguchi K. y cols manejan puntos de corte muy similares a los anteriores, Codner utiliza un PRU ≥ 235 para la identificación de

pacientes con mayor riesgo de eventos adversos después de la ICP y Haraguchi K. utiliza un punto >230 PRU para establecer su clasificación, . En base a lo anterior decidimos tomar el punto de corte de >230 PRU para la clasificación de pacientes «no respondedores» nuestra población de estudio ya que este punto es utilizado por uno de los grupos mas reconocidos, además de que es el que mostro una mejor correlación para predecir eventos adversos en el seguimiento de pacientes sometidos a ICP.

Una vez que establecimos los puntos de corte para los análisis VASP/P2Y₁₂ y VerifyNow/P2Y₁₂, se procedió a determinar el efecto antiplaquetario del Clopidogrel por citometría de flujo mediante la persistencia de VASP fosforilado y mediante el dispositivo de uso inmediato Verifynow para evaluar el índice de reactividad plaquetaria (IRP) y las unidades de reacción P2Y₁₂ (PRU) post carga y a las 24 horas de su administración.

El estudio, originalmente tenia contemplado determinar el índice de reactividad plaquetaria mediante la persistencia de VASP fosforilado por citometría de flujo y las unidades de reacción P2Y₁₂ mediante el dispositivo de uso inmediato VerifyNow posterior a la ICP, y a las 24 horas únicamente se determinaría el IRP mediante al análisis VASP, sin embargo a la mitad del estudio fue necesario realizar una modificación, ya que el reactivo para el análisis VASP no iba a ser suficiente para seguir realizando dos pruebas por paciente, y su importación aún no está regulada en nuestro país, por lo que se decidió determinar el IRP por análisis VASP únicamente en la toma previa a la ICP y para la toma de 24 horas en lugar de medir el IRP se determinaron las unidades de reacción P2Y₁₂ mediante el dispositivo de uso inmediato VerifyNow. Debido a lo anterior fue necesario crear 2 subgrupos en los cuales se pudiera comparar el IRP TPC con el IRP T24 y el PRU TPC con el PRU T24 y en el que el número de pacientes fuera el mismo.

El primer grupo a los que se les determino el IRP TPC y T24 horas por citometría de flujo mediante la persistencia de VASP fosforilado fue conformado por 16 pacientes, se obtuvo una media de 54.6393 en la toma post carga y una media de 59.9413 en la toma de 24

horas, esta diferencia ($p= 0.445$) no fue significativa aunque si se puede apreciar un ligero aumento sobre la media del IRP T24 debido a que la dosis de mantenimiento de 75 mg de Clopidogrel es considerablemente menor a la dosis de carga de 600mg de Clopidogrel administrada previa a la ICP, además de que el mismo procedimiento puede incrementar la actividad plaquetaria debido a la manipulación mecánica.

Al segundo subgrupo se les determino las unidades de reacción P2Y₁₂ TPC y T24 horas mediante el dispositivo de uso inmediato VerifyNow, este grupo estuvo conformado por 14 pacientes, se obtuvo una media de 207.2149 en la toma post carga y una media de 139.4286 en la toma de 24 horas, se obtuvo una $p= 0.036$, en este grupo se observo una diferencia significativa entre ambas tomas. A pesar de que este grupo muestra un comportamiento contrario al del IRP ($n=16$) no son comparables entre si ya que se trata de pacientes distintos y este comportamiento de puede atribuir a que el tamaño de la muestra aun es muy pequeño y los resultados podrían variar de acuerdo al numero, sin embargo cabe mencionar que cada paciente presenta una respuesta diferente al antiplaquetario la cual se puede ver afectada por varios factores.

Otro de nuestros objetivos fue identificar a pacientes respondedores y no respondedores a la dosis de carga de 600 mg del antiplaquetario Clopidogrel, mediante el análisis VASP/P2Y₁₂ y el dispositivo de uso inmediato VerifyNow/P2Y₁₂.

Para identificar a nuestra población de estudio mediante al análisis VASP/P2Y₁₂ se realizo una separación del IRP por cuartiles, se observo que solamente el 26.6% de los pacientes ubicados dentro de los dos primeros cuartiles se clasificaron como pacientes respondedores al Clopidogrel, el 36.7% se ubicaron dentro de los pacientes con poca respuesta al tratamiento y el 36.7% restante se clasifico como pacientes no respondedores al Clopidogrel.

Para la clasificación mediante el dispositivo de uso inmediato VerifyNow/P2Y₁₂ se utilizo el punto de corte PRU >230 para la clasificación de pacientes no respondedores a la terapia

con Clopidogrel, el 66.7% de los pacientes se ubicaron por debajo del punto de corte establecido y el 33.3% restante se ubicaron por encima del mismo por lo que se les clasifico como pacientes con baja respuesta al tratamiento. Cabe destacar que a ambas técnicas arrojaron datos similares lo que reafirma que existe una buena correlación entre ellas ($R= 0.774$).

El último de nuestros objetivos fue correlacionar los estados de activación e inhibición plaquetaria con los datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en el estudio. Comparamos los datos obtenidos de acuerdo al genero en donde el genero masculino presento una media de 62.9875% de IRP y 180.2083 de PRU, el genero femenino presento una media de 54.4817% IRP y 167.0000 de PRU, estas diferencias no fueron significativas estadísticamente, sin embargo si se observa que el genero masculino presenta una ligera tendencia a la alta en ambas pruebas. Otra de las comparaciones que se realizaron fue con los datos de laboratorio, a cada paciente se le midió Hematocrito, Volumen plaquetario medio (VPM) y número de plaquetas, no se encontraron valores significativos ya que todos ellos se encontraban dentro del rango normal establecido , a pesar de que varios estudios proponían que el volumen plaquetario medio (VPM) podría estar relacionado con una alta reactividad plaquetaria, en nuestro estudio no se encontró una correlación entre ambas variables.

Por ultimo se evaluaron las variables dependientes dicotómicas en las que se incluyeron Historial familiar, Dislipidemia, Tabaquismo, Hipertensión arterial y Diabetes Mellitus, se encontraron datos interesantes al comparar la Dislipidemia con el IRP toma post carga, aquellos pacientes que presentaban un cuadro de dislipidemia ($n=17$) mostraron una media del IRP TPC de 68.8918 ($p=0.036$) y los que no padecían dislipidemia ($n=13$) obtuvieron una media de 51.3408 ($p=0.034$), esto se atribuye a que la dislipidemia esta considerada como uno de los principales factores de riesgo en enfermedades cardiovasculares, por lo que un elevado nivel de grasa en la sangre va a conducir a una

mayor reactividad plaquetaria y por lo tanto un mayor riesgo de desarrollar algún evento trombótico.

Observamos también que a las 25 horas después de la ICP los pacientes hipertensos (n= 11) mostraron una media en el valor de IRP de 67.4545 ($p=0.010$), por el contrario aquellos pacientes que no padecían hipertensión (n= 5) mostraron una media en el valor de IRP de 43.4120 ($p=0.003$). Esto se explica debido a que al igual que la dislipidemia la hipertensión arterial en un factor de riesgo que puede aumentar el riesgo de muerte cardiovascular, por lo que el control de la misma constituye uno de los pilares de la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Otra de las variables que mostró resultados significativos fue el Historial familiar en el que al comparar con las unidades de reacción $P2Y_{12}$ (PRU) toma 24 horas se observó que aquellos pacientes que presentaban historia familiar positivo (n=5) mostraron una media de 91.2000 PRU ($p=0.051$) la cual sorpresivamente fue menor a la media mostrada por pacientes con un historial familiar negativo (n=9) que tuvieron una media de 166.2222 PRU ($p=0.037$), lo anterior podría explicarse debido al tamaño de la muestra ya que debido a que se trata de una variable dicotómica a la que se respondía únicamente con una respuesta positiva o negativa no es posible establecer una correlación entre los resultados obtenidos.

13. RESUMEN DE RESULTADOS

- Se encontró un alto grado de correlación entre el análisis VASP medido por citometría de flujo y el dispositivo de uso inmediato VerifyNow
- El dispositivo de uso inmediato VerifyNow es una buena opción para la determinación de reactividad plaquetaria y para guiar la terapia en pacientes con SCA.
- Se encontró una diferencia significativa entre el PRU toma post carga y el PRU toma 24 horas.
- Los pacientes que presentaban cuadros de Dislipidemia mostraron un IRP toma post carga mas elevado que aquellos pacientes que no lo presentaban.
- Se encontró un IRP toma 24 horas mas elevado en aquellos pacientes que presentaban Hipertensión arterial.

14. CONCLUSION

Los resultados observados concuerdan con los reportados en la literatura y sugieren que niveles disminuidos de EPCs pudieran estar siendo afectados por la inflamación crónica presente en pacientes con AR. Por otro lado los niveles incrementados de EC observados en pacientes con AR parecen indicar que estos pacientes presentan un proceso de apoptosis inducida por pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular o por interacciones célula-matriz inapropiadas lo cual sugiere que a mayor actividad de la enfermedad mayor es el daño endotelial.

Las concentraciones observadas de IL-6, TNF- α y P-selectina fueron significativamente mayores en el grupo con AR que en el grupo CS lo que apoya el uso de EPCs e interleucinas como biomarcadores indirectos de daño endotelial y alto riesgo cardiovascular.

Los resultados de nuestro estudio abren un nuevo punto de vista acerca de los biomarcadores celulares en el campo de la Reumatología. Las células progenitoras endoteliales prometen ser un biomarcador pronostico útil en el diagnostico de ECV sin embargo se requieren de más estudio y un consenso en su identificación para poder utilizarlas tanto como biomarcadores pronósticos, diagnósticos y herramientas terapéuticas.

15. PERSPECTIVAS

- Aunque se observó una buena correlación entre IRP-VASP y PRU-VerifyNow sería conveniente aumentar el número de muestra que permita establecer una mejor correlación entre ambas técnicas.
- Realizar la determinación de polimorfismos relacionados con enzimas involucradas en la absorción y metabolismo del Clopidogrel, así como también del propio receptor plaquetario del ADP. (ABCB1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19*3, CYP2C19*17, etc.)
- A pesar de que se encontraron correlaciones interesantes entre el PRU, IRP e historia clínica convendría realizar una recolección de datos más amplia en la que se incluyeran valores de colesterol total, colesterol fraccionado, triglicéridos.

16. REFERENCIAS

1. Altman, R. (2010). ¿Tiene implicancias clínicas la resistencia a la aspirina y/o al clopidogrel? Revista de la Federación Argentina de Cardiología, 39 (3).
2. Angel Gabriel Vargas Ruiz, D. H. (2010). Evaluación de la función plaquetaria con agregometría. Revista de Hemostasia y Trombosis, Vol. 3, No, 2.
3. Angiolillo, D. J. (2009). Pruebas de función plaquetaria en la práctica clínica: ¿estamos preparados para que pasen a la primera línea? Revista Española de Cardiología, 62(2):113-6.
4. Anjali A. Sharathkumar, A. D. (2008). Trastornos de la función plaquetaria. Federación mundial de Hemofilia, NO 19.
5. Antonio De Miguel, C. G.-G. (2008). Implicaciones clínicas de la resistencia y/o variabilidad en la respuesta al tratamiento con aspirina y clopidogrel. Revista de la Federación Argentina de Cardiología, Vol 37 Nº 3.
6. Ariana Canche Arenas, V. A. (2010). El valor de la agregometría en el diagnóstico diferencial de alteraciones plaquetarias. ACTA MÉDICA GRUPO ÁNGELES, Volumen 8, No. 1.
7. Carlos Martínez Murillo, S. Q. (2008). Hemostasia y Trombosis. México: Prado.
8. Cosmo Godino, L. M. (2009). Comparison of VerifyNow-P2Y12 test and Flow Cytometry for monitoring individual platelet response to clopidogrel. What is the cut-off value for identifying patients who are low responders to clopidogrel therapy? Thrombosis Journal, 10.1186/1477-9560-7-4.
9. Dominick J. Angiolillo, J. L. (2010). Inhibición del receptor plaquetario P2Y12 de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. Revista Española de Cardiología, 63(1):60-76.

10. José J. Lugo, M., Edgar F. Hurtado, M., Luis I. Calderón, M., Germán Gómez, M., Pablo Castro, M., Gilberto Estrada, M., & Jaime A. Fonseca, M. (2008). Resistencia al ácido acetil salicílico y al clopidogrel: una entidad clínica emergente. *Revista Colombiana de Cardiología*, Vol. 15 No. 4.
11. Víctor Huggo Córdova Pluma, P. V. (2011 Enero-Febrero). Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. *Medicina Interna de México*, 27(1):58-74.
12. Vinay Kumar, A. K. (s.f.). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier.
13. Antonio de Miguel Castro, C. C. (2009). La reactividad plaquetaria post-tratamiento predice los eventos adversos a largo plazo mejor que la respuesta al clopidogrel en pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST. *Revista Española de Cardiología*, 62(2):126-35.
14. Alf-Aage R Pettersen, H. A. (2011). The influence of CYP 2C19*2 polymorphism on platelet function testing during single antiplatelet treatment with clopidogrel. *Thrombosis Journal*, 9:4.
15. B. Al e i L, C. R. (2005). Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 85–92.
16. Clinica, U. d. (s.f.). Obtenido de <http://www.upc.com.mx/pdfs/citometria.pdf>
17. Dominick J. Angiolillo, J. J. (2011). A pharmacodynamic comparison of prasugrel vs. high-dose clopidogrel in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing anti-Platelet Therapy In diabetes Mellitus (OPTIMUS)-3 Trial. *European Heart Journal*, 32, 838–846.
18. Kyoung-hoon Lee, S. (2009). The Significance of Clopidogrel Low-Responsiveness on Stent Thrombosis and Cardiac Death Assessed by the Verifynow P2Y12 Assay in Patients With Acute Coronary Syndrome Within 6 Months After Drug-Eluting Stent Implantation. Open Access.
19. Juan José Arrieta Blanco, B. B. (2006). Valoración del sistema PFA-100 para la determinación del tiempo de hemorragia en cirugía oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11:E514-9.

20. Neal S. Kleiman, M. F. (2008). Will Measuring Vasodilator Stimulated Phosphoprotein Phosphorylation Help Us Optimize the Loading Dose of Clopidogrel? *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 51, No. 14.
21. Cao, C. (2001). Análisis Plaquetario por Citometría de Flujo. *Revista Médica*, Vol. 12 N°4.
22. María-do-Céu Monteiro, M. M. (2002). La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas. *Revista de Diagnóstico Biológico*, Vol. 51 No. 3.
23. Eigenthaler, M., & Hoschützky, H. W. (2000). Anticuerpos contra VASP (fosfoproteína estimulada por vasodilatadores), células de hibridoma para su preparación, y empleo de dichos anticuerpos. *Oficina Española de patentes y marcas*.
24. Laurent Bonello, L. C.-J.-C.-G. (2008). Adjusted Clopidogrel Loading Doses According to Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Phosphorylation Index Decrease Rate of Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With Clopidogrel Resistance : A Multicenter Randomized Prospective Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 1404–1411.
25. J. Rivera, L. N.-N. (2007). Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria. *haematologica edición española*, 92.
26. R. Paniccia, E. (2007). Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5: 1839–1847.
27. Dolores Corella, J. M. (2007). Genes, dieta y enfermedades cardiovasculares. *Investigacion y Ciencia*.
28. Badimon Lina, V. G. (2008). Enfermedad aterotrombótica coronaria: avances en el tratamiento antiplaquetario. *Revista Española de Cardiología*, 61(5):501-13.
29. José Luis Ferreira, J. A. (2011). ¿Los nuevos antagonistas del receptor P2Y12 pueden reemplazar a los inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa? *Revista Española de Cardiología*, 11(A):14-19.
30. Rabadán, I. R. (2010). Nuevos antiagregantes en el síndrome coronario agudo. El futuro es hoy. *Revista de Cardiología Española*, 10:12D-22D.

31. Barragan P, B. J. (2003). Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* , 59:295–302.
32. Bliden KP, D. J. (2007). Increased risk in patients with high platelet aggregation receiving chronic clopidogrel therapy undergoing percutaneous coronary intervention: Is the current antiplatelet therapy adequate? *J Am Coll*, 49:657– 66.
33. Bonello L, C.-J. L. (2008). Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* , 51:1404 –11.
34. Bonello L, C.-J. L. (2009). Tailored clopidogrel loading dose according to platelet reactivity monitoring to prevent acute and subacute stent thrombosis. *Am J Cardiol* , 103:5–10.
35. Bonello L, P. F.-B. (2007). Vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation analysis prior to percutaneous coronary intervention for exclusion of postprocedural major cardiovascular events. *J Thromb Haemost* , 5:1630–6.
36. Dimitrios Alexopoulos, I. X. (2012). Predictors of High On-Treatment Platelet Reactivity Early After Clopidogrel Loading in ST-Elevation Myocardial Infarction. *Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 10.1253/circj.CJ-12-0173.
37. Nicoline J. Breet, J. W. (2010). Comparison of Platelet Function Tests in Predicting Clinical Outcome in Patients Undergoing Coronary Stent Implantation. *Journal of the American Medical Association*, Vol 303, No. 8.
38. Rollini F, T.-M. A. (2012). Advances in platelet function testing assessing bleeding complications in patients with coronary artery disease. *Informa Healthcare*.
39. Laurent Bonello, N. B.-P.-G.-J. (2010). Impact of P2Y12-ADP receptor polymorphism on the efficacy of clopidogrel dose-adjustment according to platelet reactivity monitoring in coronary artery disease patients. *Thrombosis Research*, e167–e170.

40. Long Hao Yu, M. H. (2012). Impact of Platelet Function Test on Platelet Responsiveness and Clinical Outcome After Coronary Stent Implantation: Platelet Responsiveness and Clinical Outcome. *Korean Circulation Journal*, 42:382-389.
41. Pablo Codner, M. V. (2012). Clopidogrel Response Up to Six Months After Acute Myocardial Infarction. Elsevier Inc.
42. Sung Gyun Ahn, S.-H. L.-H.-W.-J.-S.-Y.-S.-H. (2012). Different Prognostic Significance of High On-Treatment Platelet Reactivity as Assessed by the VerifyNow P2Y12 Assay After Coronary Stenting in Patients With and Without Acute Myocardial Infarction. *J A C C : Cardiovascularinterventions* , Vol. 5, No. 3 .
43. Thomas Gremmel a, S. S. (2011). A high maintenance dose increases the inhibitory response to clopidogrel in patients with high on-treatment residual platelet reactivity. *International Journal of Cardiology*, IJCA-13446-5.
44. Antonio Tello-Montoliua, E. J.-V. (2012). Influencia de los polimorfismos de CYP2C19 en la reactividad plaquetaria y el pronóstico en una población no seleccionada de pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST. *Revista Española de Cardiología* , 65(3):219–226.
45. Fintel, D. J. (2012). Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: overview of current and emerging treatment options. *Vascular Health and Risk Management*, 8 77–89.
46. Gianluca Campo, M. V. (2010). Evaluation of Platelet Inhibition by Tirofiban in Patients Stratified According to Aspirin and Clopidogrel Responsiveness: The 3T/2R (Tailoring Treatment with Tirofiban in patients showing Resistance to aspirin and/or Resistance to clopidogrel). *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 55, No. 3.
47. Laurent Bonello, U. S. (2010). Consensus and Future Directions on the Definition of High On-Treatment Platelet Reactivity to Adenosine Diphosphate . *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 56, No. 12 .

48. Rakesh K Sharma, D. J. (2012). Evolving role of platelet function testing in coronary artery interventions. *Vascular Health and Risk Management*, 8 65–75.
49. Cattaneo, M. (2011). The Clinical Relevance of Response Variability to Antiplatelet Therapy. *American Society of Hematology*.
50. Gaglia MA, T. R. (2011). Correlation between light transmission aggregometry, VerifyNow P2Y12, and VASP-P platelet reactivity assays following percutaneous coronary intervention. *Journal of Interventional Cardiology*, Vol.24, 529–534.
51. Manolis Vavuranakis, D. A. (2011). Residual Platelet Reactivity After Clopidogrel Loading in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction Undergoing an Unexpectedly Delayed Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 75: 2105 – 2112.
52. Andrew Morris, B. A.-C. (2009). Platelet function analysis: A comparison of methods. *International journal of cardiology*.
53. Luca Fileti, G. C. (2011). Latest Clinical Data on Testing for High On-Treatment Platelet Reactivity . *Cardiovascular medicine* , Vol. 12 .
54. Guillaume Cayla, J.-C. M.-L.-F. (2008). Flow cytometric assessment of vasodilator-stimulated phosphoprotein: Prognostic value of recurrent cardiovascular events after acute coronary syndromes. *Archives of Cardiovascular Disease*, 101, 743—751.
55. J. M. Siller Matula, G. D. (2012). Phenotyping vs. genotyping for prediction of clopidogrel efficacy and safety: the PEGASUS-PCI study . *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 10:529-542 .
56. Jolanta M. Siller-Matula, S. P. (2008). Reproducibility and standardized reporting of the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay . *Platelets*, 19(7):551-4.
57. Morel O, E. G. (2011). Cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients undergoing percutaneous coronary intervention is mainly related to impaired P2Y12 inhibition by clopidogrel. *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 57, No. 4 .

58. Matthew J. Price, S. E. (2008). Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *European Heart Journal*, 29, 992–1000.
59. Giuseppe Patti, A. N. (2008). Point-of-Care Measurement of Clopidogrel Responsiveness Predicts Clinical Outcome in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 52, No. 14.
60. Rossella Marcucci, A. M. (2009). Cardiovascular Death and Nonfatal Myocardial Infarction in Acute Coronary Syndrome Patients Receiving Coronary Stenting Are Predicted by Residual Platelet Reactivity to ADP Detected by a Point-of-Care Assay : A 12-Month Follow-Up. *Journal of the American Heart Association*, 119:237-242.
61. B. Aleil, C. (2005). Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 85–92
62. Shlomi Matetzky, B. S. (2004). Clopidogrel Resistance Is Associated With Increased Risk of Recurrent Atherothrombotic Events in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation by the American Heart Association*, 109:3171-3175.
63. Silber S, Albertsson P, Avilés F, Carnici P, Colombo A, Hamm C et al. Guías de Práctica Clínica sobre intervencionismo coronario. *Rev Esp Cardiol*.2005; **58**(6): 679-728.
64. Marín GG. Viveros ME. Areán C. (2010) Actividad plaquetaria y endotelial en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a cateterismo cardíaco y que reciban tratamiento antiplaquetario.
65. Taboada MA., Areán C., Gutiérrez S, Marin G., García NI., Solorio R., Viveros ME. (2012). Prevalence of Clopidogrel low response in patients with coronary artery disease.

17. ANEXOS

REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT VASP/P2Y₁₂

- **Reactivo 1:** 1 frasco de 60 ml de disolvente.
- **Reactivo 2a:** 1 frasco de PGE1.
- **Reactivo 2b:** 1 frasco de PGE1 + ADP.
- **Reactivo 3:** 1 frasco de 300 l de fijador. El reactivo contiene entre un 2% y un 5% de paraformaldehído.
- **Reactivo 4a:** 1 frasco de 200 l de anticuerpo monoclonal de ratón anti VASP-P + permeabilizante.
- **Reactivo 4b:** 1 frasco de 100 l de control isotópico negativo (anticuerpo monoclonal de ratón) + permeabilizante.
- **Reactivo 5:** 1 frasco de 300 l de anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con FITC) + reactivo de detección plaquetaria marcado con PE (anti CD61-PE) + permeabilizante.

Nota: Todos los reactivos contienen azida sódica como conservante y deben ser eliminados con las precauciones pertinentes. Al verter estas soluciones en el fregadero, deberán mezclarse con grandes cantidades de agua para evitar la formación de azidas metálicas que, concentradas, pueden provocar explosiones.

RECONSTITUCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos del kit, antes de ser abiertos, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a una temperatura de 2-8° C.

Nota: No congelar el kit.

- Reactivos **1, 3, 4a, 4b y 5**: listos para usar. Estabilidad una vez abiertos: 2 meses a 2-8° C en ausencia de contaminación.
- Reactivos **2a y 2b**: Reconstituir cada frasco con 400 µl de agua destilada y homogeneizar durante 5 segundos con un agitador tipo Vórtex. Estabilidad tras la reconstitución: 1 mes a 2-8°C en ausencia de contaminación.

EQUIPO UTILIZADO

- Aparato de agitación tipo Vórtex
- Cronómetro
- Citómetro
- Tubos de hemólisis para citometría
- Gradilla para tubos de hemólisis
- Agua destilada, agua desionizada o agua para preparaciones inyectables
- Pipetas graduables con puntas desechables (10 µL)
- Pipetas (1 y 2 mL)
- Guantes



**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL GENERAL REGIONAL NÚMERO UNO**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Morelia, Michoacán _____ de _____ del _____ Clave: _____

Registrado ante el Comité Local de Investigación con el número: _____

Yo _____

de _____ años de edad, derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social, con número de afiliación _____ y con domicilio en la Calle _____ No. Exterior _____
No.interior _____ Colonia _____ C.P. _____
Población _____ Municipio _____
Estado _____ No. Telefónico _____

<input type="checkbox"/>	No acepto participar en este estudio
<input type="checkbox"/>	Si acepto participar en este estudio

Acepto en forma **VOLUNTARIA** y sin tener presiones de ninguna índole por parte de persona alguna o Institución, para participar en el proyecto de investigación titulado: **“DETERMINACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.”**

En caso de colección de material biológico

<input type="checkbox"/>	No autorizo que se tome la muestra.
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra sólo para este estudio.
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

INTRODUCCION: La siguiente información describe el protocolo al cual se le está invitando para participar de forma activa. El investigador deberá responder cualquier duda que surja a partir de la lectura de ésta.

PROPOSITO DEL ESTUDIO: La presente investigación pretende contribuir al diagnóstico temprano de disfunción endotelial y aterosclerosis acelerada mediante la correlación los niveles plasmáticos de biomarcadores protrombóticos de daño endotelial con el porcentaje de células progenitoras endoteliales circulantes.

PROCEDIMIENTO: Ha sido elegido para participar en este estudio de acuerdo a los criterios de inclusión establecidos. Se le realizarán una serie de preguntas sobre su historia clínica y la medición de presión arterial, peso, talla, índice de masa corporal, circunferencia abdominal. Se realizará toma de muestra de sangre periférica (del antebrazo) para realizar: Biometría Hemática, Velocidad de Sedimentación Globular, Proteína C reactiva y Química sanguínea. Por citometría de flujo se cuantificarán células progenitoras endoteliales.

BENEFICIOS PARA PARTICIPANTES: Los resultados proporcionarán información relevante del papel de las células progenitoras endoteliales en pacientes con Artritis Reumatoide a fin de diagnosticar tempranamente, determinar pronóstico y prevenir progresión de la disfunción endotelial a enfermedad cardiovascular. En voluntarios sanos permitirá establecer los valores normales de estas células en población mexicana, así como proporcionar información de la función endotelial del participante.

CONFIDENCIALIDAD. La información obtenida durante el desarrollo de este estudio es absolutamente confidencial y no puede ser utilizada con otro fin. Usted será informado acerca de cualquier hallazgo de importancia para su salud durante el desarrollo de este estudio.

PARTICIPACION VOLUNTARIA: Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el instituto. Además sé que puedo pedir información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio. Recibiré, si así lo solicito una copia de los resultados de laboratorio de los estudios que se me practiquen. Debo informar, tan pronto como sea posible a los investigadores de cualquier cambio importante que ocurra en mi salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (p. ej. tabaquismo, alcoholismo) o cambio de domicilio. El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven del estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

He comprendido el contenido de esta carta de consentimiento informado, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente acepto participar en este estudio.

FIRMA DEL INVESTIGADOR Y FECHA.

FIRMA DEL PACIENTE Y FECHA

FIRMA DE TESTIGO Y FECHA

FIRMA DE TESTIGO Y FECHA

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a: Dr. Miguel Ángel Álvarez Guerrero (investigador principal). Teléfono (4432594786); correo electrónico: ma_alvarezguerrero@hotmail.com Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos (Colaborador asociado). Teléfono: (4431802719); correo electrónico: sergutica@yahoo.com.mx.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a la Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx



SECRETARÍA DE SALUD
MICHOCÁN
HOSPITAL GENERAL DR.
MIGUEL SILVA
CALLE CUARTELES
SAMUEL RAMOS
MORELIA, MICH.
C.P. 58000

"MICHOCÁN TRABAJA"

DEPENDENCIA: HOSPITAL GENERAL DR. MIGUEL SILVA
DEPARTAMENTO: ENSEÑANZA E ENSEÑANZA
NÚMERO DE OFICIO: 5009/083/09
EXPEDIENTE:

ASUNTO: Aprobación de protocolo

Morelia, Michoacán, 26 de enero del 2010

Dra. Martha Eva Viveros Sandoval
Investigadora Principal
Presente

Por este conducto informo a usted que el Comité de Ética del Hospital General Dr. Miguel Silva, reviso y aprobó el protocolo de investigación titulado:

- Estudio de la Fosfoproteína estimulada por Vasodilatadores (VASP) para evaluación de reactividad plaquetaria y resistencia a clopidogrel.

Con la colaboración del Dr. Carlos Arturo Areán Martínez, adscrito al Hospital General "Dr. Miguel Silva"

Sin otro particular le envió un cordial saludo

ATENTAMENTE


DR. GUILLERMO BENZO BRAVO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA



GPB*CCAM*sev