

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**"ESTUDIO DEL FACTOR VON WILLEBRAND EN PACIENTES CON  
EVENTO VASCULAR CEREBRAL ASOCIADO A FIBRILACIÓN AURICULAR  
NO VALVULAR"**

**TESIS**

**Para obtener el grado de:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**Presenta:**

**QFB. LAURA GARCÍA QUEZADA**

**Directores de Tesis:**

**D.C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL**

**Dr. CARLOS AREÁN MARTÍNEZ**

**Morelia, Michoacán, México. Agosto 2019.**

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 las unidades de Cardiología, Neurología y Urgencias del Hospital general "Dr. Miguel Silva" de la Secretaría de salud (SSA) en la ciudad de Morelia, Michoacán así como la clínica de Enfermedad Vascular Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNN) CdMx, bajo la dirección de la D.C. Martha Eva Viveros Sandoval y del Dr. Carlos Areán Martínez.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE RESULTADOS</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>14</b>
Antecedentes	14
Factor von Willebrand	14
Estructura multimérica y función	14
Biosíntesis, almacenamiento, secreción, regulación y eliminación del Factor von Willebrand	16
Biosíntesis	16
Almacenamiento	16
Secreción	16
Regulación	17
Eliminación	17
Trombogénesis mediada por Factor von Willebrand	18
Fibrilación auricular	19
Riesgo de trombosis en fibrilación auricular	19
Estratificación del riesgo de trombosis en fibrilación auricular	21
Trombopprofilaxis en fibrilación auricular	22
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
Diseño experimental	25
Sedes del estudio	25
Población	25
Criterios de selección	26
Criterios de inclusión	26
Criterios de exclusión	26
Cálculo del tamaño de la muestra	27
Definición de los grupos de estudio	27
Descripción operativa del estudio	28
Consideraciones éticas	29
Técnicas	30
Determinación de la concentración plasmática del Factor von Willebrand mediante inmunoensayo ligado a enzima (marca Abcam)	30
Determinación de la concentración plasmática del Factor von Willebrand mediante inmunoensayo ligado a enzima (marca Biomédica)	31

Determinación de la concentración plasmática de ADAMTS-13 mediante Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)	<b>32</b>
Western blot para análisis estructural del Factor von Willebrand	<b>33</b>
Electroforesis vertical discontinua en geles de agarosa 1-1.8%	<b>33</b>
Transferencia en semi-seco	<b>34</b>
Bloqueo	<b>35</b>
Inmunodetección y revelado	<b>35</b>
Análisis densitométrico de la estructura multimérica del FvW	<b>36</b>
<b>PROCESAMIENTO DE LOS DATOS</b>	<b>37</b>
Análisis estadístico	<b>37</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
Características clínicas y demográficas	<b>38</b>
Tipo de fibrilación auricular y tromboprolifaxis	<b>44</b>
Análisis de la concentración plasmática de FvW	<b>45</b>
Análisis de la concentración plasmática de ADAMTS-13	<b>46</b>
Análisis de la estructura multimérica del Factor von Willebrand	<b>47</b>
Correlación de la concentración plasmática y composición multimérica de FvW con la concentración plasmática de ADAMTS-13	<b>51</b>
Análisis de las concentraciones de FvW y ADAMTS-13 de acuerdo al tipo de fibrilación auricular	<b>52</b>
Análisis de la concentración plasmática y composición multimérica de FvW en pacientes con y sin tratamiento anticoagulante y antiagregante	<b>53</b>
Correlación de la concentración plasmática y composición multimérica de FvW en relación al riesgo de EVC en FA	<b>54</b>
Análisis de las concentraciones de FvW de acuerdo al grupo sanguíneo	<b>56</b>
<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>71</b>
<b>Anexo I:</b> Carta de consentimiento informado	<b>71</b>
<b>Anexo II:</b> Formato de recolección de datos clínicos y bioquímicos	<b>72</b>
<b>Anexo III:</b> Soluciones para electroforesis	<b>77</b>
<b>Anexo IV:</b> Soluciones para Western blot	<b>79</b>
<b>Anexo V:</b> Reactivos, material y equipo	<b>81</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Dominios presentes en una subunidad de FvW.	<b>14</b>
<b>Figura 2:</b> Distribución multimérica en la estructura de FvW.	<b>15</b>
<b>Tabla 1:</b> Escala CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc.	<b>21</b>
<b>Tabla 2:</b> Porcentaje de riesgo de EVC en FA según la puntuación establecida por la escala de estratificación de riesgo CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc.	<b>21</b>
<b>Figura 3:</b> Media densitométrica obtenida por medio de ImageJ. Selección del patrón de bandeó para analizar. Tabla de análisis por patrón.	<b>36</b>
<b>Figura 4:</b> Detección de bandas y creación de densitogramas por medio de Image Lab.	<b>36</b>

## ÍNDICE DE RESULTADOS

<b>Figura 5:</b> Gráfico de sectores que muestra la distribución de la población de acuerdo al género.	<b>38</b>
<b>Tabla 3:</b> Características demográficas de los pacientes de acuerdo al grupo de estudio.	<b>39</b>
<b>Figura 6:</b> Comorbilidades asociadas de los pacientes incluidos en el estudio.	<b>39</b>
<b>Tabla 4:</b> Características clínicas de acuerdo al grupo de estudio.	<b>40</b>
<b>Figura 7:</b> Gráfico comparativo de la edad entre los grupos de estudio.	<b>40</b>
<b>Tabla 5:</b> Características bioquímicas de los participantes incluidos en el estudio.	<b>41</b>
<b>Figura 8:</b> Gráfico comparativo de la cuenta de leucocitos entre los grupos de estudio.	<b>42</b>
<b>Figura 9:</b> Gráfico comparativo del hematocrito expresado en porcentaje entre los grupos de estudio.	<b>42</b>
<b>Figura 10:</b> Gráfico comparativo del VPM entre los grupos de estudio.	<b>42</b>
<b>Figura 11:</b> Gráfico comparativo del colesterol total entre los grupos de estudio.	<b>43</b>
<b>Figura 12:</b> Gráfico comparativo del LDL-c entre los grupos de estudio.	<b>43</b>
<b>Figura 13:</b> Distribución de la población de acuerdo al tipo de FA.	<b>44</b>
<b>Figura 14:</b> Tratamiento anticoagulante y antiagregante en FA.	<b>44</b>
<b>Tabla 6:</b> Análisis de la concentración plasmática de FvW entre los grupos de estudio.	<b>45</b>
<b>Figura 15:</b> Gráfico comparativo de las concentraciones plasmáticas de FvW entre los grupos de estudio.	<b>45</b>
<b>Tabla 7:</b> Análisis de la concentración plasmática de ADAMTS-13 por grupo de estudio.	<b>46</b>
<b>Figura 16:</b> Gráfico comparativo de las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 entre los grupos de estudio.	<b>46</b>
<b>Tabla 8:</b> Análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW (cargada en 15 $\mu$ L) por grupo de estudio.	<b>47</b>
<b>Figura 17:</b> Gráfico comparativo del análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW entre los grupos de estudio.	<b>47</b>
<b>Tabla 9:</b> Estadística descriptiva de las concentraciones en UI de FvW presentes en los patrones de bandeos utilizados en el análisis densitométrico.	<b>48</b>
<b>Figura 18:</b> Cálculo para cargar la misma cantidad de FvW en electroforesis (0.0057 UI de FvW).	<b>48</b>
<b>Tabla 10:</b> Análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW (cargada en 0.0057 UI de FvW por paciente) por grupo de estudio.	<b>49</b>
<b>Figura 19:</b> Gráfico comparativo del análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW con la misma cantidad de proteína entre los grupos de estudio.	<b>49</b>
<b>Figura 20:</b> Análisis densitométrico de la estructura multimérica del FvW donde predomina la presencia marcada de estructuras de alto peso en los pacientes con FA.	<b>50</b>

<b>Tabla 11:</b> Tabla comparativa del FvW en EVC agudo y posterior al momento agudo.	<b>50</b>
<b>Tabla 12:</b> Correlaciones entre FvW, VPM y ADAMTS-13.	<b>51</b>
<b>Figura 21:</b> Asociación de disfunción endotelial con activación plaquetaria y Riesgo trombótico. Asociación de riesgo trombótico y activación plaquetaria.	<b>51</b>
<b>Tabla 13:</b> Análisis de ADAMTS-13 y FvW de acuerdo al tipo de FA.	<b>52</b>
<b>Tabla 14:</b> Análisis de FvW y ADAMTS-13 de acuerdo al tratamiento en FA.	<b>53</b>
<b>Figura 22:</b> Disminución en las concentraciones de ADAMTS-13 y tendencia en el incremento de MAPM en pacientes con FA no anticoagulados.	<b>53</b>
<b>Tabla 15:</b> Análisis de FvW y ADAMTS-13 con la escala de estratificación de riesgo de EVC en FA.	<b>54</b>
<b>Figura 23:</b> Incremento de las concentraciones de FvW y disminución en las concentraciones de ADAMTS13 conforme incrementa el riesgo de EVC en FA.	<b>54</b>
<b>Tabla 16:</b> Análisis del FvW con factores clínicos.	<b>55</b>
<b>Figura 24:</b> Incremento de las concentraciones de FvW con diversos factores de riesgo cardiovascular: edad, hiperglicemia, hipertensión arterial y sobrepeso/obesidad.	<b>55</b>
<b>Figura 25:</b> Distribución de la población por grupo sanguíneo.	<b>56</b>
<b>Tabla 17:</b> Análisis de FvW y ADAMTS-13 de acuerdo al grupo sanguíneo.	<b>56</b>
<b>Figura 26:</b> Gráfico que muestra la tendencia de concentraciones de FvW ligeramente menores en el grupo sanguíneo tipo O.	<b>56</b>
<b>Tabla 18:</b> Análisis de ADAMTS-13 y VPM en sujetos sanos.	<b>57</b>
<b>Figura 27:</b> Gráfico que muestra el incremento en las concentraciones de ADAMTS-13 conforme al incremento en el VPM en sujetos sanos.	<b>57</b>
<b>Tabla 19:</b> Análisis de FvW, P-selectina y cuenta de plaquetas y leucocitos.	<b>58</b>
<b>Figura 28:</b> Asociación de plaquetas y leucocitos con P-selectina y asociación del incremento en las concentraciones de FvW con el incremento en la cuenta de células blancas.	<b>58</b>
<b>Tabla 20:</b> Análisis de VPM y hematocrito en ESUS.	<b>59</b>
<b>Figura 29:</b> Gráfico que muestra la relación de incremento de activación plaquetaria conforme incrementa el hematocrito.	<b>59</b>

## ABREVIATURAS

<b>ACOD</b>	Anticoagulantes orales directos
<b>ADAMTS-13</b>	A disintegrin and metalloprotease with trombospondin type 1 motif
<b>AVK</b>	Antagonistas de la vitamina K
<b>BHC</b>	Biometría hemática completa
<b>CE</b>	Célula endotelial
<b>CI</b>	Cardiopatía isquémica
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay (Inmunoensayo ligado a enzima)
<b>ESUS</b>	Embolic strokes of undetermined source (Evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado)
<b>EVC</b>	Evento vascular cerebral
<b>FVIII</b>	Factor 8 de la coagulación
<b>FvW</b>	Factor von Willebrand
<b>FA</b>	Fibrilación auricular
<b>HAS</b>	Hipertensión arterial sistémica
<b>IC</b>	Insuficiencia cardiaca
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>MAPM</b>	Multímeros de alto peso molecular
<b>MBPM</b>	Multímeros de bajo peso molecular
<b>OI</b>	Orejuela izquierda
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAM</b>	Presión arterial media
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PTT</b>	Púrpura trombocitopénica trombótica
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>RGD</b>	Secuencia Arg-Gly-Asp
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>UA</b>	Unidades arbitrarias
<b>VPM</b>	Volumen plaquetario medio
<b>CWP</b>	Corpúsculos de Weibel Palade

## GLOSARIO

<b>ADAMTS-13</b>	Proteasa encargada de regular el tamaño de los multímeros del FvW cortando en su dominio A2
<b>Adhesión plaquetaria</b>	Interacción plaqueta-endotelio mediada por glicoproteínas plaquetarias y FvW
<b>Agarosa</b>	Polisacárido soluble en agua que forma una matriz inerte que funciona como herramienta de separación en técnicas de biología molecular
<b>Agregación plaquetaria</b>	Interacción plaqueta-plaqueta mediada por glicoproteínas plaquetarias y FvW
<b>Aterosclerosis</b>	Síndrome caracterizado por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en la capa íntima de las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre
<b>Cardiopatía Isquémica</b>	Trastorno donde parte del miocardio recibe una cantidad insuficiente de sangre y oxígeno
<b>Célula endotelial</b>	Células que forman el endotelio vascular, que es un epitelio plano simple que recubre la cara interna de los vasos sanguíneos y el corazón.
<b>Colágeno</b>	Proteína esencial en la formación del tejido conectivo
<b>Colesterol</b>	Esterol que se encuentra en los tejidos corporales y el plasma sanguíneo del ser humano. Forma parte de membranas celulares, lipoproteínas y hormonas
<b>Corpúsculos de Weibel Palade</b>	Gránulos de almacenamiento que se encuentran en las células endoteliales
<b>Creatinina</b>	Producto final del metabolismo de la creatina que se encuentra en el tejido muscular del ser humano, se excreta por la orina
<b>Deformabilidad eritrocitaria</b>	Cambio de forma de un eritrocito bajo cierto nivel de estrés aplicado, sin que exista hemolisis
<b>Disfunción endotelial</b>	Desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predisponen a inflamación, vasoconstricción e incremento de la permeabilidad vascular y que facilitan el

<b>Electroforesis</b>	desarrollo de arteriosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis  Técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico según su tamaño
<b>ELISA</b>	Técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable
<b>Estenosis</b>	Estrechamiento del espacio dentro de un vaso sanguíneo
<b>Evento Vascular Cerebral</b>	Daño en el tejido cerebral consecuente a la ausencia o disminución del flujo sanguíneo y la falta en el aporte de oxígeno y glucosa
<b>Fibrilación Auricular Valvular</b>	Arritmia supraventricular consecuente a daño en alguna válvula cardíaca
<b>Frecuencia cardíaca</b>	Número de contracciones del corazón o pulsaciones por unidad de tiempo
<b>Frecuencia respiratoria</b>	Número de respiraciones que realiza un ser vivo en un periodo específico de tiempo
<b>Glicoproteína</b>	Molécula compuesta por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos, tiene funciones estructurales y de reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas
<b>Glucosa</b>	Glúcido monosacárido formado por 6 carbonos, es un azúcar simple que el cuerpo humano utiliza como fuente principal de energía para las células
<b>Gránulos <math>\alpha</math> plaquetarios</b>	Gránulos de almacenamiento plaquetarios (50-80 por plaqueta) que contienen FvW, fibrinógeno, P-selectina, factor de crecimiento plaquetario, $\beta$ -tromboglobulina, PF4, etc.
<b>IMC</b>	Medida que asocia el peso de un individuo con su talla
<b>Insuficiencia Cardíaca</b>	Patología donde el corazón no puede bombear de forma eficiente la sangre
<b>Integrinas</b>	Glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular y median las interacciones célula- célula o célula-matriz extracelular, cuentan con diversas funciones en varios procesos

	biológicos como agregación plaquetaria, inflamación, función inmune, reparación de tejidos, metástasis celular e intervienen en patologías como cáncer, trombosis y enfermedades inflamatorias
<b>Plaquetas</b>	Células enucleadas de 1-2 $\mu$ m de tamaño, generadas en médula ósea por fragmentación de los bordes de los megacariocitos, mediadoras de coagulación e inflamación
<b>Presión arterial diastólica</b>	Valor de la presión arterial cuando el corazón se encuentra en reposo (fase de diástole). Su valor normal es entre 60-80 mmHg
<b>Presión arterial media</b>	Presión promedio en un ciclo cardiaco completo. Su valor normal es entre 70-105 mmHg
<b>Presión arterial sistólica</b>	Valor de la presión arterial cuando el corazón se encuentra en fase sístole (fase de contracción del músculo cardiaco). Su valor normal es entre 90-120 mmHg
<b>Púrpura Trombocitopénica Trombótica</b>	Enfermedad caracterizada por un proceso de agregación intravascular, su fisiopatología se basa en la deficiencia de la metaloproteasa ADAMTS13
<b>Reología</b>	Especialidad de la física centrada en el análisis de los principios que determinan el movimiento de los fluidos
<b>RGD</b>	Secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp del FvW donde se lleva a cabo la unión a integrinas
<b>Triglicéridos</b>	Biomolécula formada por tres moléculas de ácidos grasos en combinación con una molécula de glicerol alcohol, constituyen la principal forma de almacenamiento de energía
<b>Urea</b>	Sustancia orgánica resultante de la degradación de sustancias nitrogenadas en el organismo, se excreta a través de la orina
<b>Volumen plaquetario medio</b>	Biomarcador de activación plaquetaria. Evalúa el tamaño medio de las plaquetas sanguíneas, que al cambiar su estado de inactivo a activo modifican su volumen.
<b>Western blot</b>	Técnica que permite la separación de una proteína de una compleja mezcla de ellas

## RESUMEN

**Antecedentes:** La tendencia trombogénica en fibrilación auricular (FA) es multifactorial e involucra alteraciones hemodinámicas, estasis sanguínea y disfunción endotelial que perpetúa el estado pro-trombótico y promueve la formación de trombos intracavitarios y embolismo cerebral y sistémico. El Factor von Willebrand (FvW) es una glicoproteína plasmática multimérica reconocida como biomarcador de activación plaquetaria y disfunción endotelial. Aunque actúa biológicamente en procesos de hemorragia y trombosis, su funcionalidad se ve incrementada de acuerdo a su tamaño estructural; las formas multiméricas de alto peso molecular (MAPM) poseen elevada capacidad trombogénica permitiéndole actuar en el reclutamiento, adhesión y agregación plaquetaria. **Objetivo:** Evaluar la composición multimérica de FvW vinculada a las concentraciones plasmáticas de FvW y ADAMTS-13 en pacientes con FA y EVC. **Material y métodos:** Pacientes con FANV, pacientes con evento vascular cerebral (EVC) isquémico de origen cardioembólico secundario a FA, pacientes con EVC de origen indeterminado (ESUS) y sujetos sanos. Determinación de concentración plasmática de FvW por medio de ELISA y estructura multimérica mediante Western Blot. **Resultados:** Se incluyeron un total de 124 pacientes con una edad promedio de  $61 \pm 18$  años, distribuidos en los siguientes grupos: pacientes con FA (n=33), pacientes con FA/EVC agudo (n=19), pacientes con FA y antecedente de EVC (n=20), ESUS (n=29) y Sujetos sanos (n=23). El 56.5% pertenece al género femenino y el 43.5% al género masculino. Se observó un incremento en la composición multimérica ( $P=0.006$ ) y la concentración plasmática ( $P=0.005$ ) de FvW en los grupos con FA en comparación con los sujetos sanos, además de una disminución en las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 en los grupos con desarrollo de EVC en comparación con los grupos con ausencia de EVC. También se observó el incremento en las concentraciones del FvW ( $P=0.000$ ) y disminución de las concentraciones de ADAMTS-13 ( $P=0.000$ ) en relación a  $CHA_2DS_2VASC$ . **Conclusiones:** Las concentraciones elevadas y la estructura multimérica en formas de alto peso molecular del FvW conjunto a las concentraciones disminuidas de ADAMTS-13 representan un factor de riesgo tromboembólico en FA.

**Palabras clave:** Factor von Willebrand, Fibrilación Auricular, Evento Vascular Cerebral, Trombosis, Disfunción endotelial.

## ABSTRACT

**Background:** The thrombogenic tendency in atrial fibrillation (AF) is multifactorial, it involves hemodynamic alterations, blood stasis, inflammation and endothelial dysfunction that perpetuate the pro-thrombotic state and promote the formation of intracavitary thrombi and cerebral and systemic embolism. Von Willebrand Factor (vWF) is a multimeric plasma glycoprotein recognized as a biomarker of platelet activation and endothelial dysfunction. Although it acts physiologically in hemorrhage and thrombosis, its functionality is increased according to its structural size; the high molecular weight multimeric forms (HMWM) have high thrombogenic capacity allowing it to act in the recruitment, adhesion and platelet aggregation. **Objective:** To evaluate the multimeric composition of vWF related to changes in vWF and ADAMTS-13 plasma levels in patients with AF and stroke. **Patients and methods:** Patients with non-valvular AF, patients with cardioembolic stroke and AF, patients with embolic stroke of undetermined source (ESUS) and healthy subjects. Quantification of vWF and ADAMTS-13 plasma levels by enzyme-linked immunoassay (ELISA) and analysis of the multimeric structure by Western Blot. **Results:** 124 patients with a mean age of  $61 \pm 18$  years were included, classified in the following groups: patients with non-valvular AF (n=33), patients with AF and acute stroke (n=19), patients with AF and antecedent of stroke (n=20), ESUS (n=29) and healthy subjects (n=23). 56.5% are female and 43.5% male. High molecular weight multimers ( $P=0.006$ ) and vWF plasma levels ( $P=0.005$ ) were observed in groups with AF when compared to healthy subjects, in addition to a decrease in ADAMTS-13 plasma levels in the stroke groups (patients with AF and acute stroke ( $P=0.000$ ) and ESUS ( $P=0.031$ )) compared to groups with no stroke (AF ( $P=0.035$ ) and controls). An association was also observed between the increase in vWF concentrations ( $P=0.000$ ) and decrease in ADAMTS-13 concentrations ( $P=0.000$ ) in relation to the risk of stroke in AF defined by  $CHA_2DS_2VAsc$ . **Conclusion:** High vWF plasma concentrations, the presence of high molecular weight multimers and the decreased concentrations of ADAMTS-13 represent an important thromboembolic risk factor in AF.

## MARCO TEÓRICO

### Antecedentes

#### Factor von Willebrand

El Factor von Willebrand (FvW) es una proteína multimérica trombogénica que se sintetiza, almacena y libera específicamente en células endoteliales (75-80%) y plaquetas (20-25%) (1).

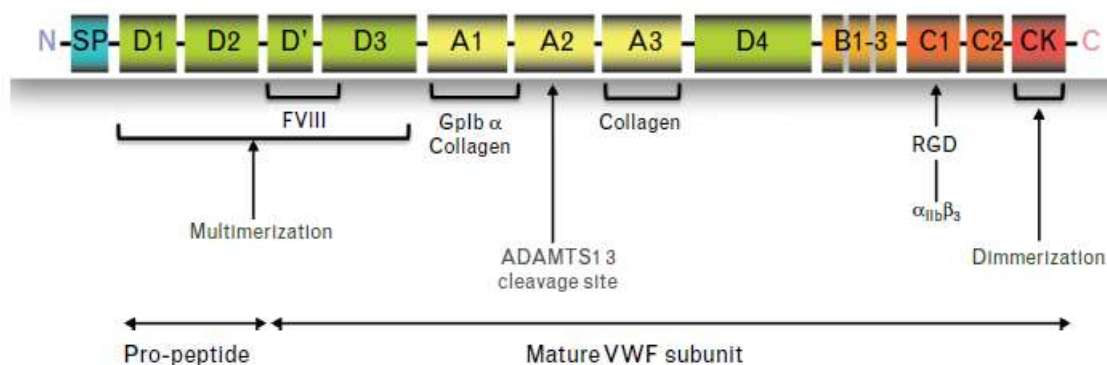
Se encuentra presente en:

1. El plasma sanguíneo
2. La matriz subendotelial
3. Sitios de almacenamiento:
  - Gránulos  $\alpha$  plaquetarios
  - Corpúsculos de Weibel Palade (CWP) de las células endoteliales (2).

La concentración plasmática de FvW puede variar de acuerdo a la edad, el género y la raza. En un estudio realizado en población mexicana en sujetos sanos se obtuvo una concentración plasmática de FvW de entre 55-136 UI/dL (3).

#### Estructura multimérica y función

El FvW tiene una estructura multimérica compuesta por subunidades que se organizan en dominios designados de la A-D.



**Figura 1:** Dominios presentes en una subunidad de FvW (4).

Los dominios D1, D2, D' y D3 participan en el proceso de formación de multímeros, las regiones D' y D3 median la unión con el FVIII de la coagulación y el dominio A1 y A3 poseen propiedades de unión al colágeno (colágeno

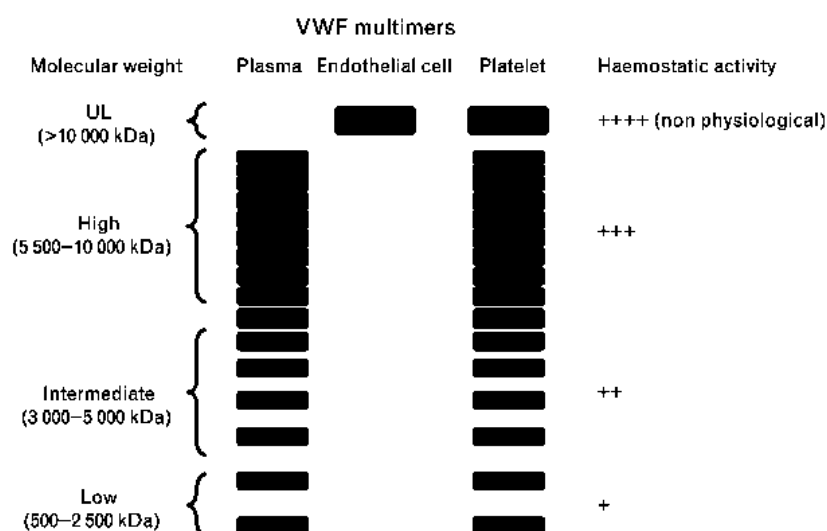
microfibrilar tipo VI para A1 y colágeno fibrilar tipo I y III para A3). También interactúa con las glicoproteínas plaquetarias GpIb $\alpha$  y  $\alpha$ IIb $\beta$ III mediante los dominios A1 y C1 (Figura 1) (5).

Esta organización estructural le permite cumplir tres importantes funciones en hemostasia:

1. Actúa como transportador y protector del Factor VIII de la coagulación evitando su degradación proteolítica por la proteína C activada (6).
2. Actúa como intermediario de adhesión plaquetaria (interacción plaqueta-endotelio) mediante la unión a la glicoproteína plaquetaria GpIb $\alpha$ .
3. Facilita la agregación plaquetaria (interacción plaqueta-plaqueta) mediante la unión a la glicoproteína plaquetaria  $\alpha$ IIb $\beta$ III (GpIIb IIIa) (2).

El FvW es la proteína más grande en la circulación sanguínea, su tamaño va de 800-20000 kDa y circula en varios tamaños de acuerdo a su peso molecular:

- Multímeros de bajo peso molecular (MBPM) (500-2500 kDa).
- Multímeros de peso molecular intermedio (MPMI) (3000-5000 kDa).
- Multímeros de alto peso molecular (MAPM) (5500-10000 kDa).
- Multímeros de ultra alto peso molecular (>10000 kDa) que se encuentran en los sitios de almacenamiento (Figura 2).



**Figura 2:** Distribución multimérica en la estructura de FvW (4).

Todos los tamaños de multímeros de FvW son funcionales, sin embargo hay un incremento en la funcionalidad con respecto al tamaño ya que se involucra una

mayor cantidad de sitios de unión, por lo que los multímeros de alto peso tienen mayor capacidad trombogénica (7).

## **Biosíntesis, almacenamiento, secreción, regulación y eliminación del Factor von Willebrand**

### **Biosíntesis**

El FvW se codifica en el brazo corto del cromosoma 12, el RNAm codifica para un pre-pro-polipéptido de FvW. Este producto inicial pierde una fracción llamada "péptido de señal", lo que inicia el proceso de formación de la proteína (8).

Después de la pérdida del péptido de señal, el pro-polipéptido forma dímeros a través de puentes disulfuro en las porciones carboxi-terminales en el retículo endoplásmico. Posteriormente se lleva a cabo la glicosilación en el aparato de Golgi y por medio de puentes disulfuro en las porciones amino-terminales de los dímeros se van constituyendo series de multímeros que se componen desde 2 hasta más de 60 subunidades que conforman la proteína madura (9)(8)(2).

### **Almacenamiento**

Después de la síntesis, el FvW es transportado a los sitios de almacenamiento en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas y los corpúsculos de Weibel-Palade de las células endoteliales donde el pH ligeramente ácido favorece el empaquetamiento en largos túbulos helicoidales, proceso que se lleva a cabo mediante el autoensamblaje de sus subunidades a través de interacciones intermoleculares entre los dominios (9)(2).

### **Secreción**

El FvW es liberado de los sitios de almacenamiento mediante tres tipos de secreción:

- Secreción basal: un único CPW se fusiona con la membrana celular y libera su contenido.
- Secreción regulada: tras la estimulación endotelial inducida por agonistas múltiples los CWP se agregan formando una gran vesícula secretora que resulta en la liberación de cantidades masivas de multímeros.

- La desacidificación del CWP induce la pérdida del empaquetamiento helicoidal del FvW, que es liberado de los túbulos pero queda retenido dentro del resto del CWP(2).

Las células endoteliales combinan la liberación basal y regulada de FvW, mientras que las plaquetas requieren de su previa activación para liberar FvW por vía regulada (9)(2).

### **Regulación**

Los multímeros de ultra alto peso molecular del FvW que son liberados de los sitios de almacenamiento se someten a una reducción fisiológica controlada mediante un evento de fragmentación proteolítica en el dominio A2 (entre los a.a. Tyr1605 - Met1606) regulado por ADAMTS-13 (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif), metaloproteasa multidominio que se sintetiza en las células estrelladas del hígado (10)(11) y circula en concentraciones plasmáticas de 740-1420 ng/mL en sujetos sanos (12).

La única función conocida de ADAMTS13 es la regulación del tamaño de los multímeros de FvW por lo que establece un control sobre la actividad trombogénica de estos. Aunque ADAMTS-13 circula como enzima activa, el FvW no se proteoliza continuamente en la circulación debido a que tiene la capacidad de modificar su arreglo estructural en respuesta al flujo sanguíneo y no se ve expuesto cuando circula en forma globular ya que los dominios A2 involucrados en la interacción con ADAMTS-13 se encuentran ocultos (9)(11).

### **Eliminación**

Los macrófagos se involucran en la eliminación del FvW mediante endocitosis mediada por receptores, uno de ellos es el receptor de lipoproteínas LRP1 (2)(13). La vida media del FvW en la circulación sanguínea es de aproximadamente 12 horas (8).

Los determinantes antigénicos del sistema de grupo sanguíneo ABO intervienen en la proteólisis y el aclaramiento del FvW. El FvW posee antígenos ABH unidos a las cadenas de oligosacáridos N-ligados. La N-glicosilación modula la síntesis y secreción de FvW por lo que se ve afectada su tasa de eliminación, además los determinantes antigénicos que posee el FvW están involucrados en su susceptibilidad a la proteólisis por ADAMTS-13 (14), motivo por el que las concentraciones plasmáticas de FvW varían de acuerdo al tipo sanguíneo; la población con tipo sanguíneo O tiene concentraciones 25% menores de FvW en comparación con la población que posee grupo sanguíneo tipo No-O (8)(13).

## **Trombogénesis mediada por Factor von Willebrand**

La velocidad de desplazamiento de la sangre a través de la vasculatura permite clasificar el flujo sanguíneo en laminar cuando este es ordenado (flujo normal de la circulación sanguínea) o turbulento cuando este es caótico e irregular como consecuencia del incremento en la velocidad del flujo (15).

Dependiente de la velocidad del flujo es la fuerza que se ejerce sobre la pared del vaso sanguíneo (Shear stress), esta fuerza tiene la capacidad de estimular al endotelio ya que este es susceptible a los cambios en las fuerzas hemodinámicas que detecta mediante mecanorreceptores (16).

El FvW tiene la capacidad de cambiar su estatus funcional de inactivo a altamente reactivo mediante cambios en la conformación de su estructura en respuesta a alteraciones en el flujo sanguíneo. En condiciones de flujo laminar circula en forma globular ocultando sus dominios de interacción con plaquetas, sin embargo al adherirse al colágeno expuesto mediante sus dominios A3 en sitios de lesión conjunto a cambios en la fuerza y velocidad del flujo sanguíneo, la estructura del FvW cambia de forma globular a cadena elongada exponiendo así la totalidad de sus dominios y capturando las plaquetas circulantes. Las plaquetas poseen en su superficie alrededor de 20 000 receptores de GpIb que pueden interactuar con FvW sin que la plaqueta este activada, esta unión permite a las plaquetas rodar en las células endoteliales y el subendotelio dañado estableciendo una interacción de baja afinidad que consecuentemente da lugar a activación plaquetaria, lo que desencadena la liberación de FvW de los gránulos  $\alpha$  creando agregados plaquetarios estables formados por la interacción de FvW con la glicoproteína plaquetaria  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (1), por lo que la formación progresiva de agregados es el resultado de la acción conjunta de dos receptores plaquetarios centrales y su principal ligando en condiciones de shear stress (FvW) (17) (9)(18)(19).

En concentraciones elevadas, el FvW es un biomarcador representativo de disfunción o daño endotelial y activación plaquetaria, por lo que ha sido estudiado en diferentes patologías cardiovasculares donde la integridad del endotelio se ve alterada y que predisponen a riesgo trombótico (20).

## **Fibrilación auricular**

La Fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardiaca más frecuente en la práctica clínica. Es una taquiarritmia supraventricular caracterizada por una activación auricular rápida y desorganizada que produce latidos cardiacos irregulares (21). La prevalencia en FA está íntimamente relacionada con la edad avanzada y alrededor del 70% de los casos se produce en mayores de 65 años (22). Se ha estimado que el 60.7% de las arritmias en México son debidas a FA, de las cuales el 65.7% son de tipo no valvular (23).

La FA se clasifica en:

- Paroxística: El episodio de FA termina de manera espontánea dentro de un período máximo de 7 días.
- Persistente: La arritmia se mantiene por más de 7 días o persiste de manera ininterrumpida por un periodo de 12 meses.
- Permanente: No se contempla el restablecimiento del ritmo sinusal (21)(24).

El electrocardiograma (ECG) en FA se caracteriza por la ausencia de la onda P y la presencia de oscilaciones rápidas u ondas fibrilatorias (ondas f) que varían en amplitud, forma e intervalo (24).

La FA no es una arritmia letal, sin embargo sus consecuencias son múltiples. Se asocia con insuficiencia cardiaca (taquicardiomiopatía) y elevado riesgo trombotico, la FA es responsable del 20% de los eventos vasculares cerebrales (EVC) (21), del 25% de los EVC isquémico, del 50% de los EVC cardioembólicos (23) y en pacientes  $\geq 80$  años es la causa directa de un cuarto de los episodios (22), por lo que el tratamiento se basa principalmente en el control del ritmo o el control de la frecuencia cardiaca, el control de las enfermedades subyacentes (hipertensión arterial, diabetes mellitus, obesidad, etc.) y la tromboprolifaxis con anticoagulantes orales directos (ACOD) y antagonistas de la vitamina K (AVK) (25). El tratamiento anticoagulante se elige de acuerdo a las características de cada paciente a partir de su valoración mediante las escalas de estratificación de riesgo de EVC en FA (CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc) (Tabla 1) y sangrado (HASBLED) (23)(21).

## **Riesgo de trombosis en fibrilación auricular**

Los mecanismos fisiopatológicos asociados con la elevada tendencia trombogénica en FA son complejos y multifactoriales. La triada de Virchow involucra tres factores: hipercoagulabilidad, estasis sanguínea y disfunción endotelial, sin embargo otros factores como la edad avanzada, hipertensión

arterial, diabetes mellitus, obesidad, insuficiencia cardíaca y antecedentes de tromboembolia son también constituyentes de riesgo en el desarrollo de eventos tromboembólicos en FA (21)(26)(27).

Otro mecanismo de trombosis en FA además del descrito en la triada de Virchow que principalmente involucra estasis sanguínea y factores de la coagulación, es el que se lleva a cabo en condiciones de shear stress elevado que involucra la superficie pro-trombótica de las plaquetas y la estructura multimérica del FvW (18). La estasis sanguínea consecuente a las alteraciones hemodinámicas en FA promueve la formación de trombos intracavitarios en la orejuela izquierda, siendo esta la causa del evento vascular cerebral (EVC) isquémico de origen cardioembólico, que desencadena daño o muerte neuronal como consecuencia de la disminución del aporte de oxígeno y glucosa resultante de la reducción o interrupción del flujo sanguíneo por obstrucción de una arteria cerebral ocasionada por un trombo (26).

La detección de FA por electrocardiograma al momento de un EVC ocurre en el 6.7% de los casos, con un Holter de 24h en el 10.6% de los casos y con un monitoreo de 7 días en el 16.4% de los casos. Después de que se evalúa el EVC y no existe etiología definida este se denomina evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado (ESUS) y ocurre entre el 30-40% de los infartos cerebrales (28). Los ESUS representan el 20% de los EVC isquémicos. Hay una alta prevalencia de FA paroxística no detectada en ESUS y se han reportado episodios breves de FA no reconocida previamente en el 10%-20% de los pacientes cuando la duración de la monitorización electrocardiográfica ambulatoria (Holter) es más prolongada de 24 horas (29). La probabilidad de detección de FA paroxística aumenta con el tiempo de monitorización, como se demostró en los estudios EMBRACE (30) o CRYSTAL-AF (31) donde se observó una proporción de hasta 4 veces de FA de nuevo diagnóstico con monitorización electrocardiográfica de 72h en comparación con 24h en ESUS (32). Los criterios de diagnóstico en ESUS abarcan que el EVC sea no lacunar, de mecanismo embólico, ausencia de aterosclerosis >50% intra o extracraneal, ausencia de causa de cardioembolismo mayor (FA permanente o paroxística, flutter auricular, trombo intracardiaco, prótesis valvular, estenosis mitral, infarto agudo del miocardio (IAM) <4 semanas y fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) <30%) y ausencia de causa inhabitual de EVC (arteritis, migraña, drogas). Los ESUS se presentan comúnmente entre los 18-55 años de edad (29)(32).

### Estratificación del riesgo de trombosis en fibrilación auricular

Los principales factores individuales que se asocian con el riesgo tromboembólico en los pacientes con FA fueron integrados en una escala de estratificación de riesgo (Tabla 1)(25):

Puntuación CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc		
<b>C</b>	Insuficiencia cardiaca o disfunción sistólica ventricular izquierda	<b>1</b>
<b>H</b>	Hipertensión arterial	<b>1</b>
<b>A</b>	Edad ≥ 75 años	<b>2</b>
<b>D</b>	Diabetes mellitus	<b>1</b>
<b>S</b>	ACV, AIT, Tromboembolia	<b>2</b>
<b>V</b>	Enfermedad vascular (IAM previo, enfermedad arterial periférica, placa aórtica)	<b>1</b>
<b>A</b>	Edad 65-74 años	<b>1</b>
<b>Sc</b>	Categoría de sexo (femenino)	<b>1</b>
Total (máximo 9 puntos)		

- 0** Riesgo bajo
- 1** Riesgo moderado
- ≥2** Riesgo elevado

**Tabla 1:** Escala CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc

Mediante un puntaje la escala CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc permite estimar un porcentaje de riesgo de EVC (Tabla 2).

Puntaje CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>% Riesgo EVC</b>	<b>0</b>	<b>1.3</b>	<b>2.2</b>	<b>3.2</b>	<b>4</b>	<b>6.7</b>	<b>9.8</b>	<b>9.6</b>	<b>6.7</b>	<b>15.2</b>

**Tabla 2:** Porcentaje de riesgo de EVC en FA según la puntuación establecida por la escala de estratificación de riesgo CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc (24).

## Tromboprolifaxis en fibrilación auricular

El tratamiento en FA se basa en la prevención del tromboembolismo con anticoagulantes orales:

- **Antagonistas de la Vitamina K:** Actúan inhibiendo la carboxilación (dependiente de vitamina K) de los Factores II, VII, IX y X produciendo una menor actividad coagulante (Warfarina, acenocumarina).
- **Inhibidores del Factor X activado (Xa):** Actúan en el sitio activo del factor Xa que tiene un papel central en la propagación de la coagulación e inhiben tanto el factor Xa libre en el plasma como el factor Xa unido al complejo protrombinasa (Ribaroxabán, Apixabán, Edoxabán).
- **Inhibidores directos de la trombina:** Inhiben tanto la trombina libre como la trombina unida al coágulo, la trombina es fundamental en la formación del coágulo debido a que convierte el fibrinógeno en fibrina. También es un potente inhibidor plaquetario (Dabigatrán) (33) (34).

Tanto los anticoagulantes orales directos (ACOD) como los antagonistas de la vitamina K (AVK) han mostrado ser efectivos en la tromboprolifaxis del EVC en pacientes con FA, sin embargo los AVK tienen una farmacocinética compleja que obliga a vigilar continuamente el tiempo de protrombina, frecuentes ajustes a la dosis, elevado riesgo de hemorragia e interacciones con otros fármacos y alimentos en comparación con los ACOD (23).

## JUSTIFICACIÓN

El Evento Vascular Cerebral (EVC) constituye la segunda causa global de muerte según la organización mundial de la salud y hasta el 50% de los EVC de origen cardioembólico son consecuentes a Fibrilación auricular (FA), lo que incrementa el riesgo de mortalidad hospitalaria y cifras importantes de pacientes con secuelas físicas y neurológicas que involucran déficits sensoriales, visuales, cognitivos y de motricidad.

Entre los factores de riesgo de EVC en FA se incluyen las alteraciones hemodinámicas, el estado protrombótico y la disfunción endotelial, sin embargo el mecanismo trombogénico en FA no está enteramente dilucidado y a pesar de la eficacia de los anticoagulantes, el riesgo de EVC en FA es persistente.

Las estrategias actuales de prevención del tromboembolismo en FA se basan principalmente en tratar la estasis sanguínea y el estado protrombótico omitiendo un factor de riesgo persistente que puede ocurrir incluso antes de que las complicaciones sean evidentes: la disfunción endotelial. El endotelio vascular es intermediario en procesos trombóticos e inflamatorios y la determinación de biomarcadores de disfunción endotelial podría facilitar una mejor estratificación del riesgo ya que es una condición de características heterogéneas que requiere una intervención multifactorial.

La concentración plasmática del Factor von Willebrand es un biomarcador representativo de disfunción o daño endotelial y estructuralmente es una molécula con numerosas interacciones funcionales que desempeña un papel importante como intermediario en condiciones de inflamación vascular, transporte molecular, reclutamiento, adhesión y agregación plaquetaria por lo que además se asocia con riesgo de EVC en FA. La estructura multimérica del FvW ha sido ampliamente estudiada en Enfermedad de von Willebrand (EvW), una patología hemorrágica hereditaria que cursa con deficiencias en la concentración y estructuras de alto peso molecular del FvW, donde el análisis multimérico es parte crucial para establecer el diagnóstico. Sin embargo, la estructura multimérica del FvW no ha sido lo suficientemente estudiada en condiciones de trombosis como lo ha sido en hemorragia.

## HIPÓTESIS

Los pacientes con evento vascular cerebral asociado a fibrilación auricular no valvular presentan estructura con marcada presencia de multímeros de alto peso molecular del Factor von Willebrand asociado a concentraciones plasmáticas elevadas del factor y disminución en las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 con respecto a grupo control.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Determinar la composición multimérica de FvW vinculada a las concentraciones plasmáticas de FvW, las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 y la estratificación del riesgo de evento vascular cerebral asociado a fibrilación auricular.

### Objetivos específicos:

1. Integrar una cohorte de pacientes y obtener datos clínicos, demográficos y de laboratorio.
2. Comparar las concentraciones plasmáticas y estructura multimérica de FvW y concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 en pacientes con EVC asociado a FA (proceso agudo y posterior a proceso agudo), pacientes con EVC sin FA (ESUS), pacientes con FA sin desarrollo de EVC y sujetos aparentemente sanos.
3. Correlacionar la concentración plasmática y composición multimérica de FvW con la concentración plasmática de ADAMTS-13.
4. Correlacionar la concentración plasmática de FvW y ADAMTS-13 y la composición multimérica de FvW con riesgo de EVC en FA.
5. Comparar concentración plasmática y composición multimérica de FvW en pacientes con y sin tratamiento anticoagulante y antiagregante.
6. Correlacionar la concentración plasmática y estructura multimérica de FvW con datos clínicos y bioquímicos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño experimental**

Estudio descriptivo, observacional, analítico, prospectivo, transversal.

### **Sedes del estudio**

El desarrollo experimental y el proceso de reclutamiento de pacientes se llevaron a cabo en las siguientes instituciones:

- Laboratorio de hemostasia y biología vascular. División de estudios de posgrado. Facultad de ciencias médicas y biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).
- Servicios de cardiología, neurología y urgencias del hospital general "Dr. Miguel Silva" SSA de Morelia, Michoacán.
- Clínica de enfermedad vascular cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Dr. Manuel Velazco Suárez" (INNN), en la Ciudad de México.

### **Población**

Pacientes con evento vascular cerebral y fibrilación auricular documentada mediante electrocardiograma de 12 derivaciones o monitorización electrocardiográfica ambulatoria de 24 horas (Holter).

Se integraron cinco grupos de estudio:

- I. Pacientes con EVC agudo asociado a FANV
- II. Pacientes con FANV y antecedente de EVC
- III. Pacientes con fibrilación auricular
- IV. ESUS
- V. Grupo control

## **Criterios de selección**

### **Criterios de inclusión**

- Género indistinto
- Edad  $\geq$  40 años para FA.
- Edad indistinta para ESUS.
- Fibrilación auricular no valvular documentada mediante electrocardiograma de 12 derivaciones o monitorización electrocardiográfica ambulatoria de 24h (Holter), sin tratamiento anticoagulante.
- Pacientes con EVC isquémico de origen cardioembólico secundario a FA en estado agudo (1-15 días), con o sin tratamiento anticoagulante.
- Pacientes con FA y antecedente de EVC ( $>15$  días - 2 años), con o sin tratamiento anticoagulante.
- Pacientes que deseen participar en el estudio y hayan firmado la carta de consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión:**

- Pacientes con fibrilación auricular secundaria a valvulopatía.
- Pacientes con enfermedades autoinmunes.
- Pacientes con hipertiroidismo.
- Pacientes con cardiopatía reumática.
- Pacientes con enfermedad renal crónica (tasa de filtración glomerular  $<60$  ml/min/1.73m<sup>2</sup> SC) o alteraciones en la función hepática (TGO o TGP  $> 2$  veces mayor su valor normal de referencia, hiperbilirrubinemia  $>1.5$  sobre su valor normal, plaquetopenia  $<100\ 000/mm^3$ , anemia con hemoglobina  $<9$  gr/Dl).
- Pacientes cuyas muestras sanguíneas resulten lipémicas o hemolizadas.

## Cálculo del tamaño de la muestra

La muestra se calculó para población finita, con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{K (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Dónde:

N= número de sujetos necesarios por grupo.

K=  $(Z\alpha + Z\beta)^2 = 7.9$

$\sigma_1$ = Desviación estándar del grupo EVC= 20.2

$\sigma_2$ = Desviación estándar del grupo FA= 23

$\mu_1$ = Media del grupo EVC= 168 UI/mL

$\mu_2$ = Media del grupo FA= 154 UI/mL

Sustitución:

$$n = \frac{(7.9) (20.2^2 + 23^2)}{(168 - 154)^2}$$

n= 37 pacientes por grupo

## Definición de los grupos de estudio

**Grupo con FA y EVC agudo:** Paciente con EVC en estado agudo (0-15 días) con diagnóstico previo o reciente de FANV con o sin tratamiento anticoagulante.

**Grupo con FA y antecedente de EVC:** Paciente con FA y antecedente de EVC (>15 días - 2 años) con o sin tratamiento anticoagulante.

**Grupo con FA:** Pacientes con fibrilación auricular no valvular (FANV) documentada mediante electrocardiograma de 12 derivaciones o monitorización electrocardiográfica ambulatoria de 24h (Holter) sin tratamiento anticoagulante.

**ESUS:** Pacientes con EVC en los que se haya descartado el origen cardioembólico, estenosis ateromatosas de los vasos de cuello o intracerebrales del territorio infartado y los EVC lacunares.

**Grupo control:** Sujetos aparentemente sanos pareados por edad y género con la media resultante entre los grupos de pacientes.

## Descripción operativa del estudio

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes que cumplieron con los criterios de selección y que aceptaron participar en el estudio. Una vez que firmaron su carta de consentimiento informado, se realizó:

### Valoración antropométrica

- Peso
- Talla
- Índice de masa corporal (IMC)

### Toma de signos vitales

- Presión arterial (sistólica, diastólica, media)
- Frecuencia cardíaca
- Frecuencia respiratoria

### Historia clínica completa (Anexo II):

- Uso previo de fármacos anticoagulantes (acenocumarina, warfarina, enoxaparina, inhibidores de trombina, inhibidores del factor Xa).
- Uso previo de antiagregantes plaquetarios (aspirina, clopidogrel).
- Enfermedades concomitantes: hipertensión arterial, diabetes mellitus u obesidad.
- Presencia o ausencia de hemorragia digestiva, hemorragia intracraneal o cirrosis hepática de recién diagnóstico (últimos 3 meses).
- Tipo de FA.

Posteriormente se realizó recolección de sangre periférica mediante venopunción de antebrazo (con ayuno mínimo de 4 horas).

Se colectaron 15mL de sangre venosa en 4 tubos tipo Vacutainer cerrados al vacío para recolección de muestras sanguíneas, cuyo procesamiento se distribuyó de la siguiente forma:

Se enviaron dos tubos (un tubo seco y un tubo con EDTA) con muestra de sangre al laboratorio clínico del Hospital General “Dr. Miguel Silva” para realizar determinaciones bioquímicas:

- Biometría Hemática Completa.
- Hemotipo.
- Química Sanguínea IV (glucosa, urea, creatinina, ácido úrico).
- Perfil de Lípidos (colesterol total, Colesterol-LDL, Colesterol-HDL, Colesterol-VLDL, triglicéridos).

El resto (un tubo seco y un tubo con citrato de sodio) fueron transportados al laboratorio de hemostasia y biología vascular para su debida separación y almacenamiento donde:

1. Los tubos con muestra sanguínea fueron transportados en hielera especial equipada con enfriadores que permitieron conservar la temperatura y por lo tanto la integridad de la muestra (dentro de la primera hora de la toma de la muestra).
2. Las muestras fueron centrifugadas, separadas en suero o plasma y debidamente etiquetadas para posteriormente ser almacenadas en crioviales tipo Eppendorf congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el ultracongelador.
3. Para finalizar, los desechos de suero o plasma fueron inactivados primariamente en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 30 minutos y se desecharon de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 utilizando recipiente rígido de polipropileno de color rojo.

### **Consideraciones éticas**

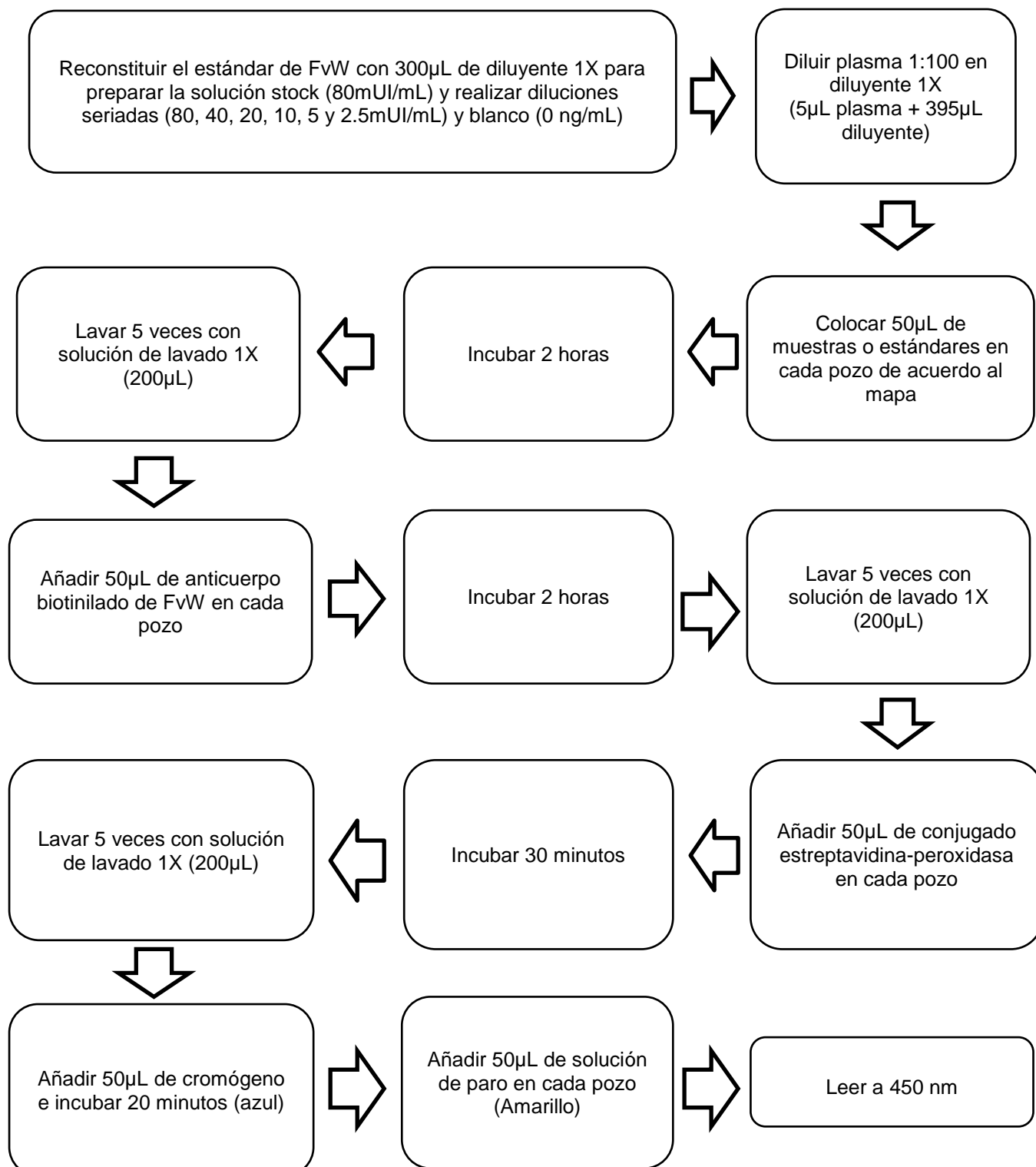
En el presente estudio se respetaron las disposiciones contenidas en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud que clasifica este tipo de investigación como investigación de riesgo mínimo, así como los principios éticos para la investigación médica en seres humanos numerados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (AMM), al igual que fueron considerados los principios básicos del Código de Núremberg entre los que se destaca el consentimiento voluntario del participante expresado mediante una carta de consentimiento informado para participación en estudios de investigación clínica (Anexo I) que enfatiza la naturaleza del estudio, su carácter voluntario, los investigadores responsables, la ausencia de riesgos para la salud, los beneficios esperados, la confidencialidad de los datos y la salida voluntaria en caso de que así desee.

Este proyecto de investigación fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Investigación del Hospital General "Dr. Miguel Silva" (SSM) y el Comité de Investigación y Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" de la UMSNH.

## Técnicas

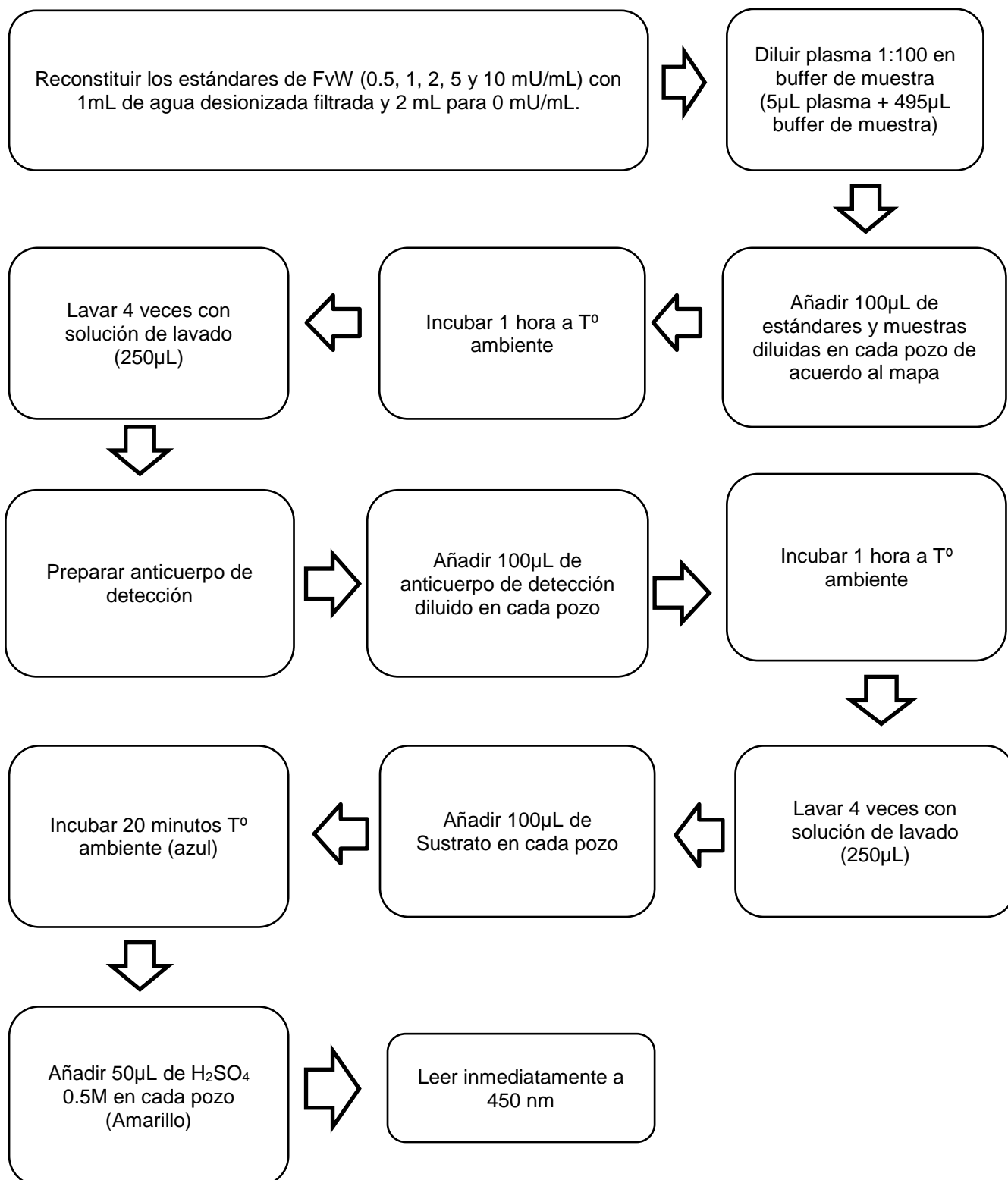
### Determinación de la concentración plasmática de FvW mediante inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

Este procedimiento se realizó mediante un kit de ELISA FvW ABCAM® ab108918.



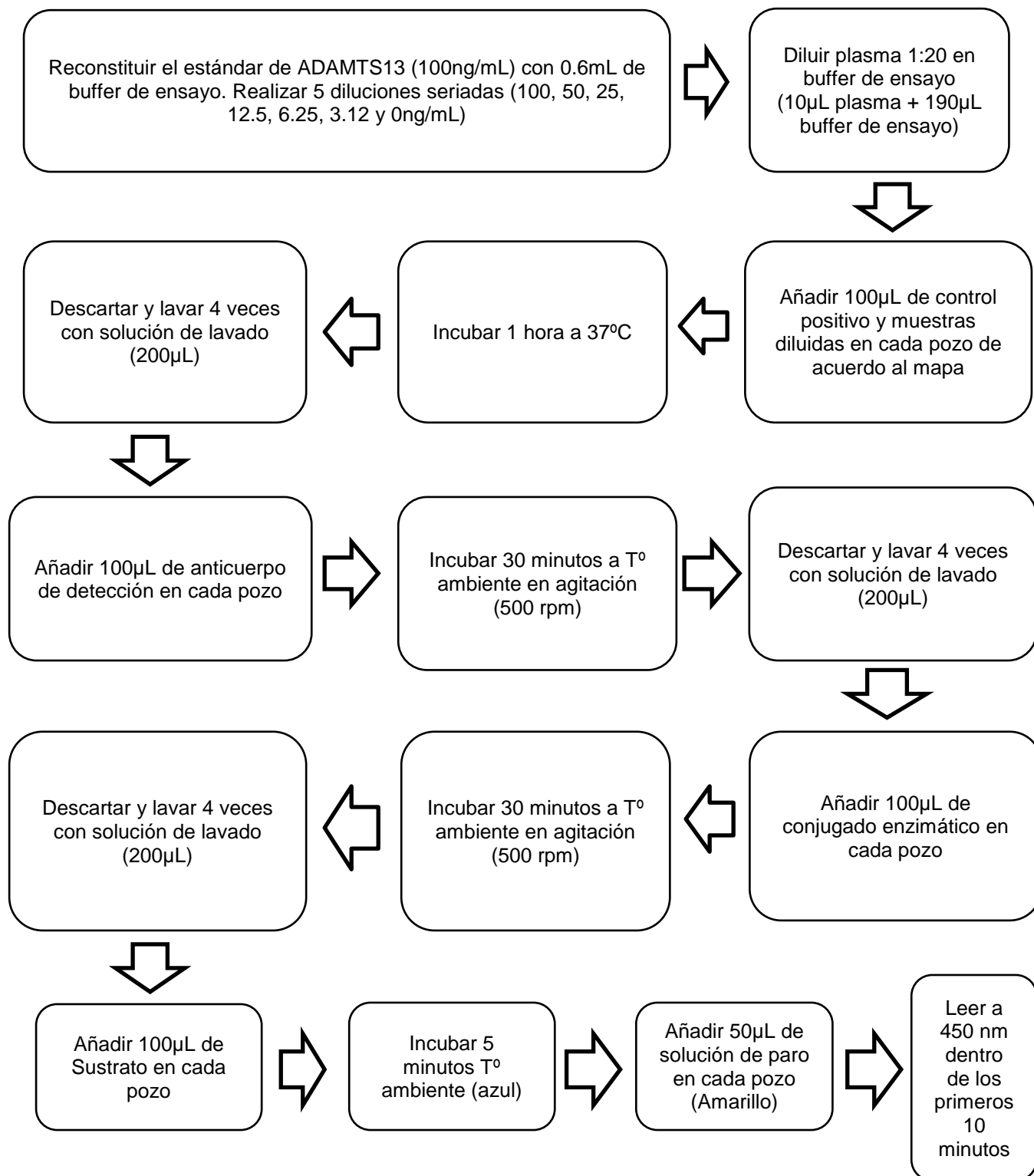
## Determinación de la concentración plasmática de FvW mediante Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

Este procedimiento se realizó mediante un kit de ELISA FvW Biomédica.



### Determinación de la concentración plasmática de ADAMTS-13 mediante Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

Este procedimiento se realizó mediante un kit de ELISA ADAMTS-13 Biomédica.

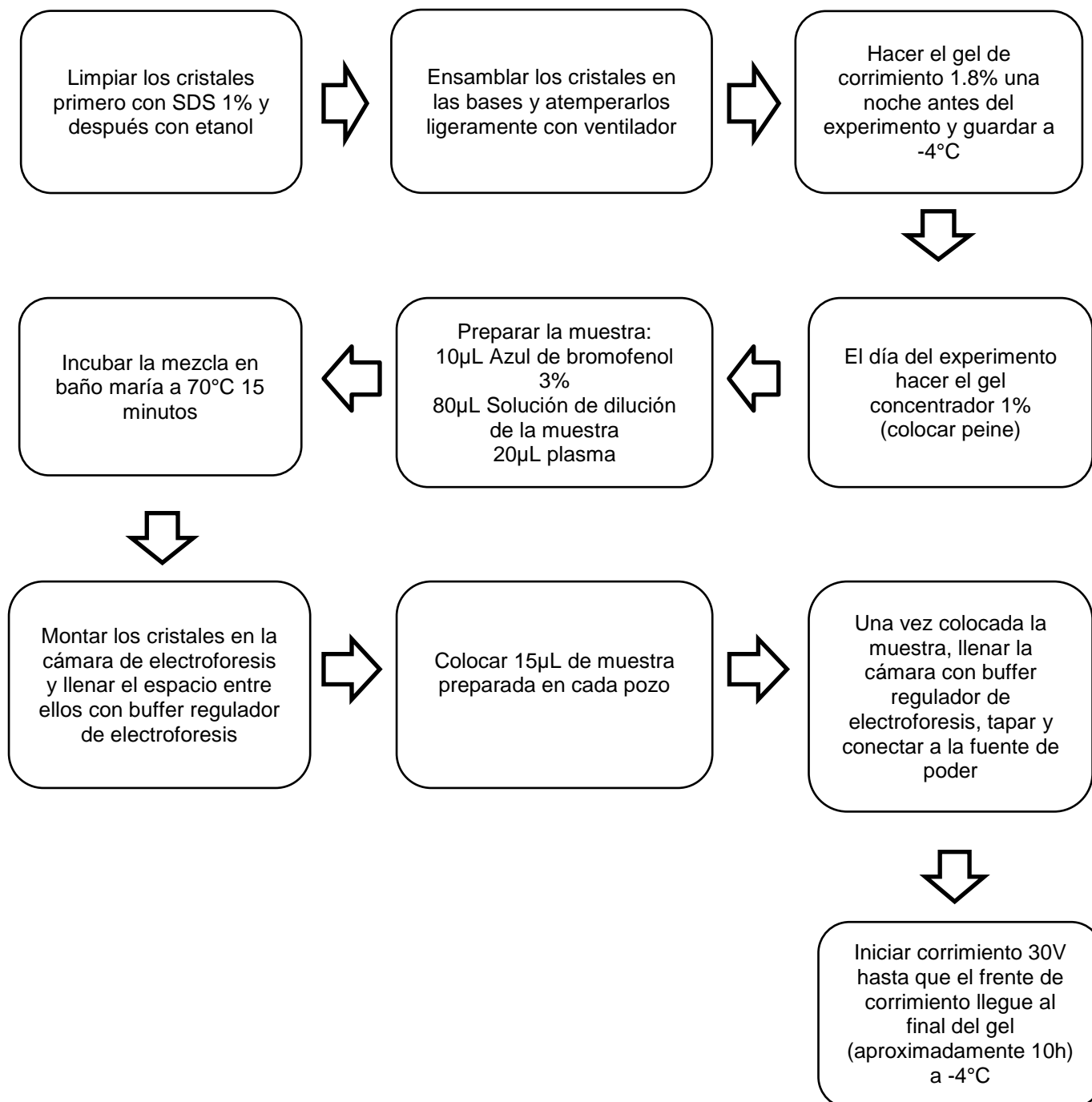


## Western blot para análisis estructural del Factor von Willebrand (35)

### Electroforesis vertical discontinua en geles de agarosa 1-1.8%

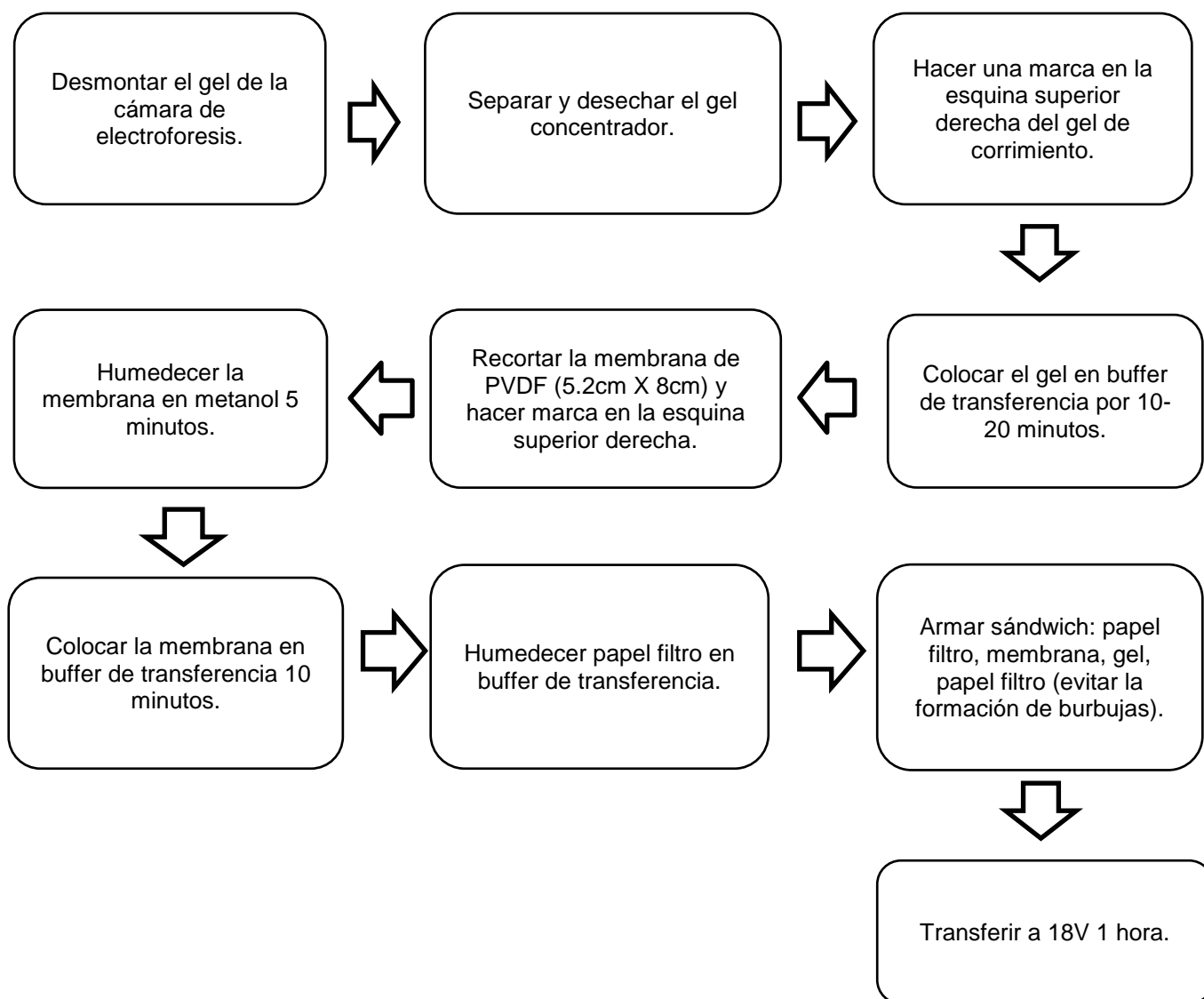
Se utilizó plasma pobre en plaquetas obtenido con citrato de sodio al 3.2% centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos.

Preparar previamente todas las soluciones necesarias (Anexo III).



### Transferencia en semi-seco

Preparar previamente todas las soluciones necesarias (Anexo IV).

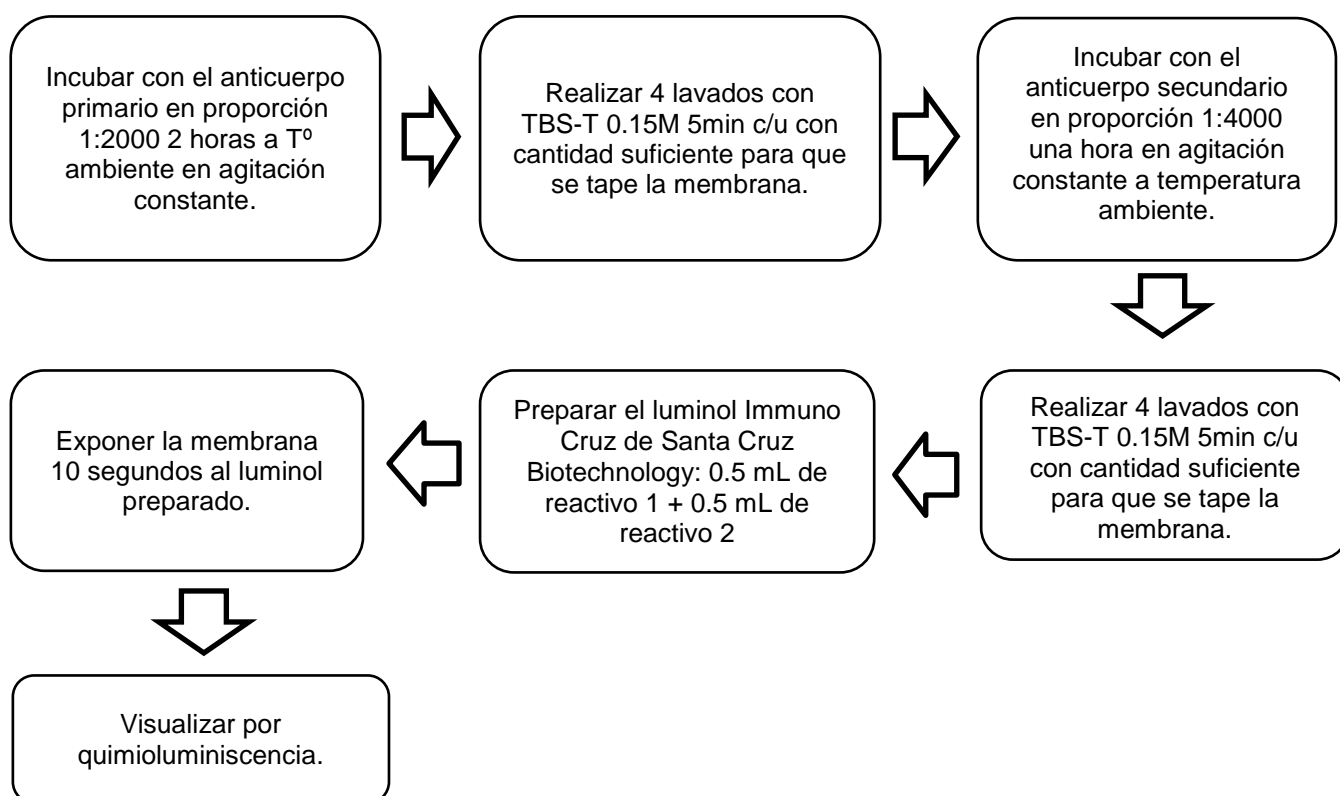


**Nota:** se puede detener el Western blot en este paso guardando la membrana en TBS sin tween a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta por 72 horas.

## Bloqueo

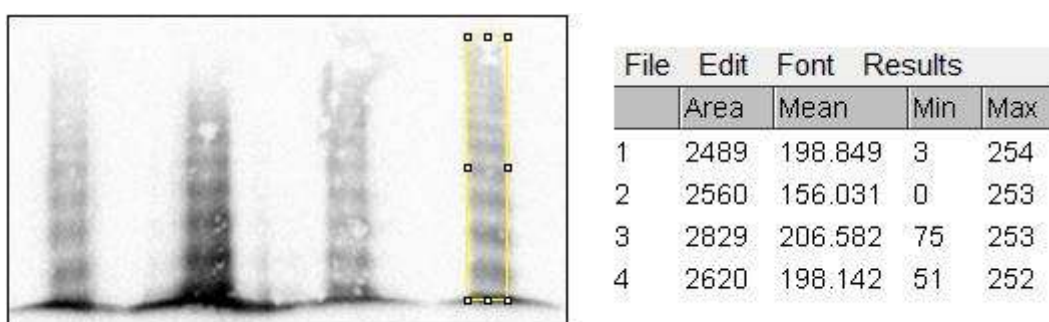
Colocar la membrana en solución de bloqueo (10mL de TBS-T 0.15M + 0.03g albúmina) 30 minutos en agitación constante.

## Inmunodetección y revelado

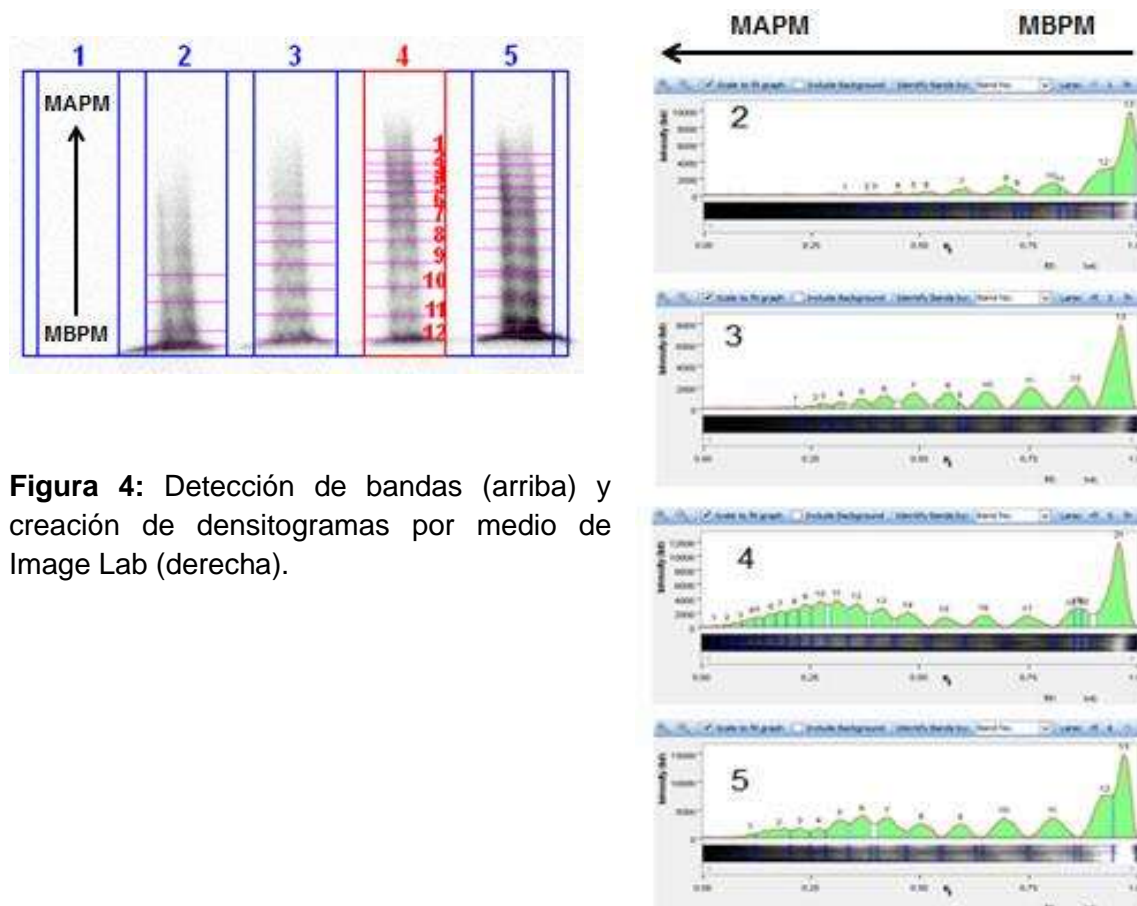


### Análisis densitométrico de la estructura multimérica del FvW

El análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW se realizó mediante los programas ImageJ 1.50b e Image Lab 5.2.1 de BIO-RAD, a través de los cuales se obtuvo una media en unidades arbitrarias de la intensidad de las bandas que componen el patrón de bandeo (Figura 3) y un densitograma representativo del volumen de cada banda que permite su clasificación en alto/bajo peso molecular que coincide con la distribución multimérica resultante de la movilidad electroforética del patrón de bandeo obtenido mediante western blot (Figura 4).



**Figura 3:** Media densitométrica obtenida por medio de ImageJ. Selección del patrón de bandeo para analizar (izquierda). Tabla de análisis por patrón (derecha).



**Figura 4:** Detección de bandas (arriba) y creación de densitogramas por medio de Image Lab (derecha).

## PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos de la historia clínica, parámetros de laboratorio, concentraciones plasmáticas (FvW, ADAMTS-13) y distribución multimérica del FvW fueron documentados en una base de datos, donde se utilizó en el análisis estadístico y descriptivo el programa SPSS software versión 22.

### Análisis estadístico

- Se realizó estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar).
- Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección de Lilliefors para evaluar la normalidad de los datos y de acuerdo a su comportamiento las variables cuantitativas se reportaron con medias y desviación estándar mientras que las variables cualitativas se reportaron con frecuencias y porcentajes.
- Para los contrastes de las variables clínicas y bioquímicas, el análisis densitométrico de la estructura multimérica y las concentraciones del FvW y ADAMTS-13 entre grupos se realizó ANOVA de una vía con post hoc Tukey o Kruskal Wallis para muestras independientes de acuerdo a la normalidad de los datos.
- Para estimar la asociación del análisis densitométrico de la estructura multimérica y las concentraciones del FvW y ADAMTS-13 con variables clínicas y bioquímicas se realizó correlación de Pearson y Spearman.
- Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos por valor de  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Características clínicas y demográficas

Se incluyeron en este estudio un total de 124 pacientes distribuidos en los siguientes grupos:

26.6% Pacientes con FA no valvular (n=33).

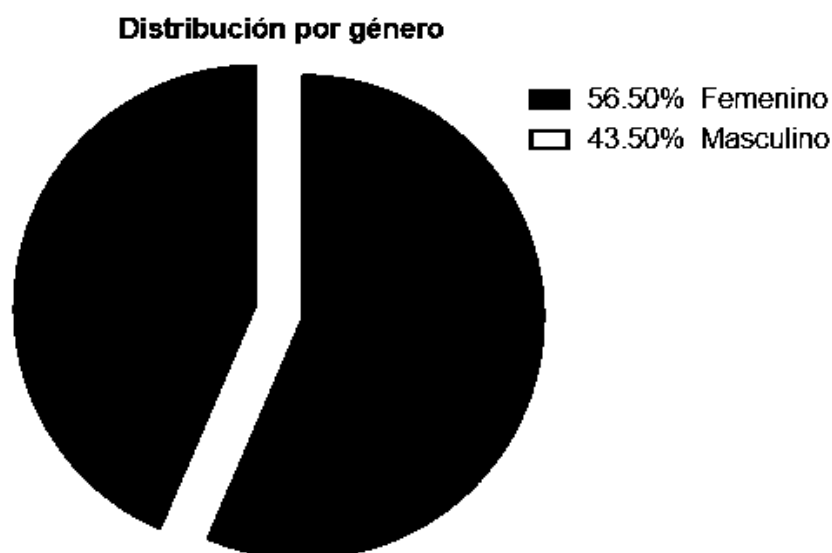
15.3% Pacientes con FA y EVC agudo (n=19).

16.1% Pacientes con FA y antecedente de EVC isquémico de origen cardioembólico (n=20).

23.4% Pacientes con evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado (ESUS) (n=29).

18.5% Sujetos sanos (n=23).

El 56.5% de los participantes pertenecieron al género femenino y el 43.5% al género masculino (Figura 5), con una edad promedio de  $61 \pm 18$  años con un mínimo de 22 y un máximo de 95. Las variables demográficas, clínicas y bioquímicas que fueron tomadas en cuenta se describen en las tablas 3, 4 y 5.



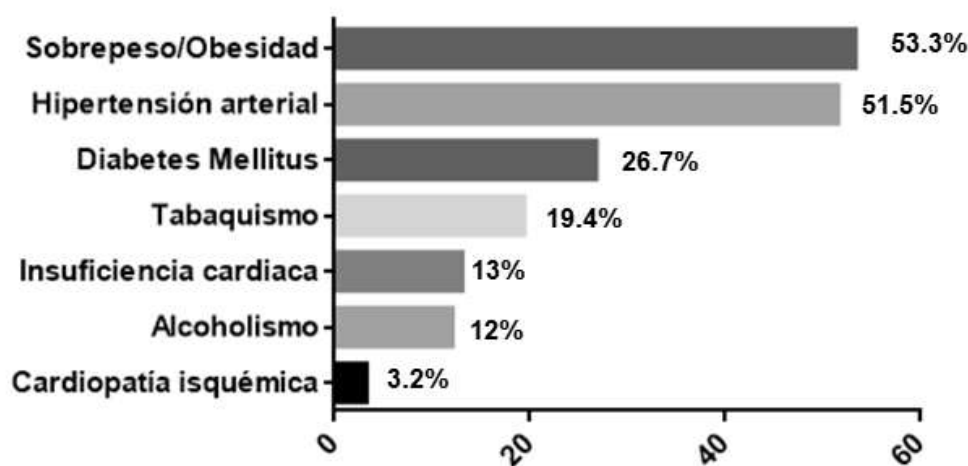
**Figura 5:** Gráfico de sectores que muestra la distribución de la población de acuerdo al género.

**Tabla 3.** Características demográficas de los pacientes de acuerdo al grupo de estudio.

<b>Variables demográficas</b>				
<b>Variable</b>	<b>FA/EVC agudo (n=19)</b>	<b>FA/antEVC (n=20)</b>	<b>FA (n=33)</b>	<b>ESUS (n=29)</b>
<b>HAS</b>	10 (52%)	9 (45%)	21 (63%)	12 (41%)
<b>DM</b>	6 (31%)	7 (35%)	10 (30%)	4 (13%)
<b>Sobrepeso / Obesidad</b>	4 (21%)	11 (55%)	16 (48%)	17 (58%)
<b>Tabaquismo</b>	4 (21%)	2 (10%)	4 (12%)	8 (27%)
<b>Alcoholismo</b>	2 (10%)	2 (10%)	6 (18%)	1 (3%)
<b>Cardiopatía isquémica</b>	1 (5%)	1 (5%)	1 (3%)	0%
<b>Insuficiencia cardiaca</b>	2 (10%)	3 (15%)	7 (21%)	0%

Datos expresados en frecuencia (porcentaje) de positivos. **HAS:** Hipertensión arterial sistémica. **DM:** Diabetes mellitus. **EVC:** Evento vascular cerebral. **ESUS:** Evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado.

El 51.5% de los pacientes tenía HAS, el 26.7% DM y el 53.3% sobrepeso/obesidad (Figura 6).

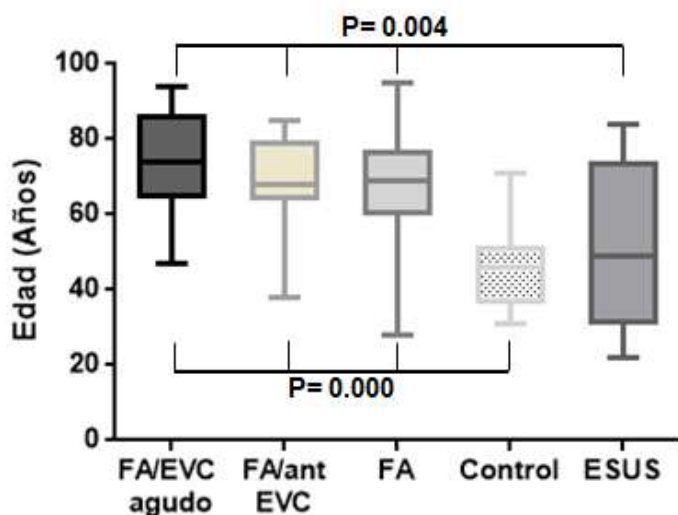


**Figura 6.** Comorbilidades asociadas de los pacientes incluidos en el estudio.

**Tabla 4.** Características clínicas de acuerdo al grupo de estudio.

Variables clínicas						
Variable	FA/EVC agudo (n=19)	FA/antEVC (n=20)	FA (n=33)	ESUS (n=29)	Control (n=23)	P
<b>Edad (Años)</b>	73±15 (47-94)	68±12 (38-85)	68±15 (28-95)	52±20 (22-84)	46±11 (31-71)	<b>0.000 (A)</b>
<b>PAS (mmHg)</b>	128±18	128±11	132±15	125±16	122±13	0.289(A)
<b>PAD (mmHg)</b>	79±16	74±8	79±12	77±7	80±7	0.297(K)
<b>PAM (mmHg)</b>	95±16	92±7	96±11	93±9	93±8	0.756(A)
<b>FC (Latidos/minuto)</b>	79±15	68±16	71±15	76±18	65±2	0.294(A)
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	25±6	26±6	27±5	26±4	23±2	0.079(A)

Datos expresados en media ± desviación estándar. (Valor mínimo – valor máximo). **PAS:** Presión arterial sistólica. **PAD:** Presión arterial diastólica. **PAM:** Presión arterial media. **FC:** Frecuencia cardiaca. **IMC:** Índice de masa corporal. Prueba ANOVA de una vía post hoc Tukey **(A)**. Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes **(K)**. Significancia  $P < 0.05$ .



La prevalencia de FA en los pacientes se muestra en edad avanzada en comparación con los grupos ESUS y control (Figura 7).

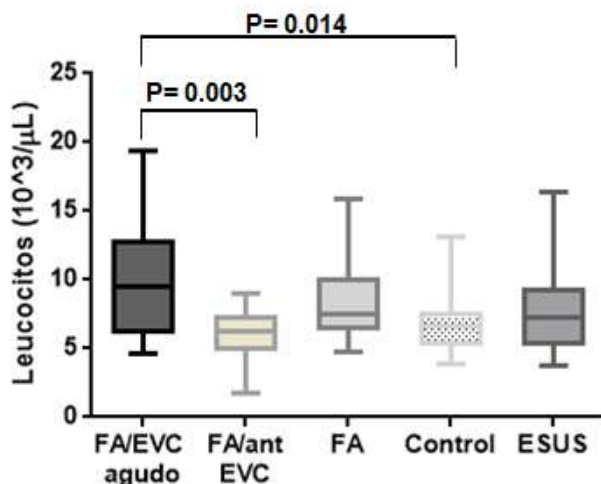
**Figura 7:** Gráfico comparativo de la edad entre los grupos de estudio.

**Tabla 5.** Características bioquímicas de los participantes incluidos en el estudio.

Variables bioquímicas						
Variable	FA/EVC agudo (n=19)	FA/antEVC (n=20)	FA (n=33)	ESUS (n=29)	Control (n=23)	P
<b>Leucocitos (Leucocitos/L)</b>	9.83±4.12	6.19±1.90	8.38±2.86	7.66±2.85	6.88±2.17	<b>0.002 (A)</b>
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	148.17±83.6	115.21±67.9	111.1±36.6	95.73±15.5	91.38±27.1	<b>0.002 (K)</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	125.1±32.6	147.8±58.6	155.66±34.7	141.8±30.6	186.8±41.3	<b>0.023 (A)</b>
<b>HDL-c</b>	37.74±11	44.61±11.7	45.3±16.3	44±16.2	49±12.4	0.692 (A)
<b>LDL-c</b>	80.3±26.6	76.6±29.1	108.9±31.6	81.4±26.4	115.8±40.4	<b>0.002 (A)</b>
<b>TG (mg/dL)</b>	86.2±31.4	144.4±122.1	142.6±61.5	134.3±74	156.3±72.5	0.223 (A)
<b>Plaquetas (Plaquetas/L)</b>	212±103	234±97	267±115	251±66	247±64	0.370 (A)
<b>VPM (fL)</b>	10.17±1.88	10.42±1.17	10.24±0.98	10.71±1.11	9.37±1.65	<b>0.006 (A)</b>
<b>Hematocrito (%)</b>	39±6	40.4±5.5	43.6±8.8	46.3±5.3	40.4±4	<b>0.003 (A)</b>

Datos expresados en media ± desviación estándar. **CT:** Colesterol total. **HDL-c:** Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad. **LDL-c:** Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad. **TG:** Triglicéridos. **VPM:** Volumen plaquetario medio. Prueba ANOVA de una vía post hoc Tukey **(A)**. Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes **(K)**. Significancia P<0.05.

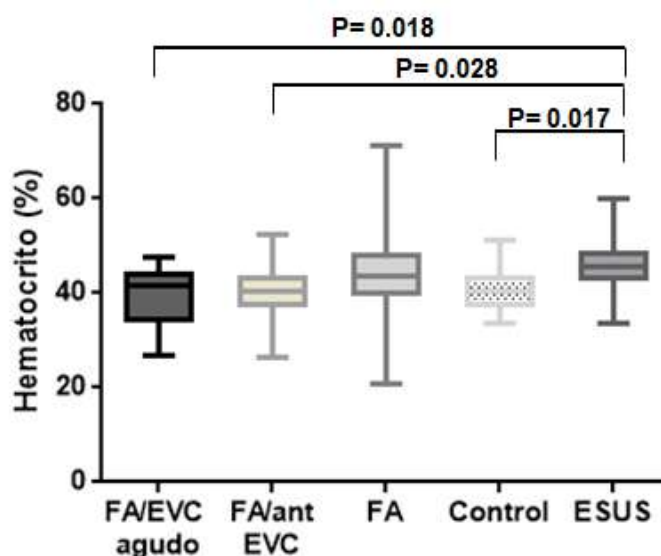
Se observaron diferencias en las variables bioquímicas entre los grupos de estudio:



Incremento en las células blancas secundario al proceso inflamatorio agudo (Figura 8).

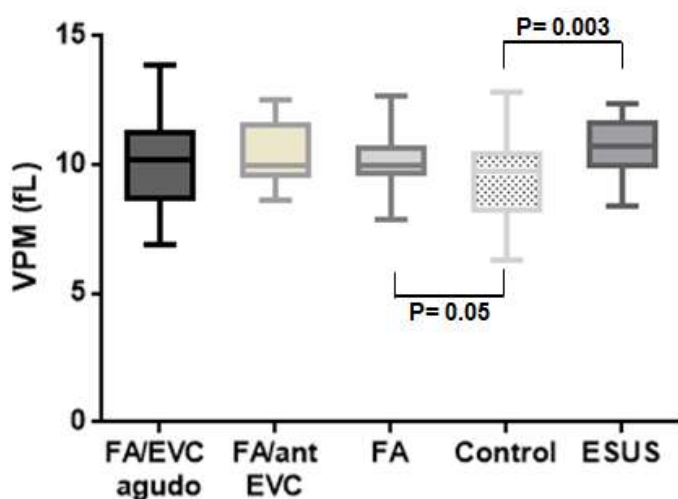
**Figura 8:** Gráfico comparativo de la cuenta de leucocitos entre los grupos de estudio.

Incremento en el volumen de glóbulos rojos con relación al total de sangre en el grupo ESUS en comparación con el resto de los grupos (Figura 9).

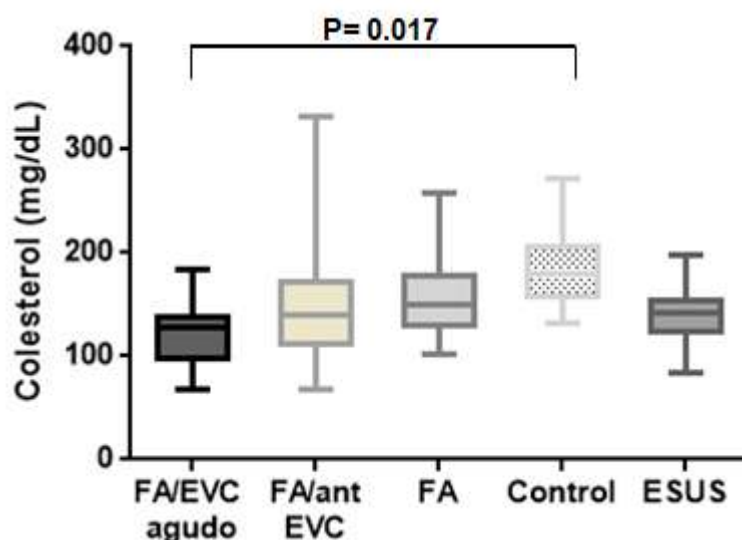


**Figura 9:** Gráfico comparativo del hematocrito expresado en porcentaje entre los grupos de estudio.

Incremento en la activación plaquetaria en pacientes con FA y ESUS en comparación con los sujetos sanos (Figura 10).

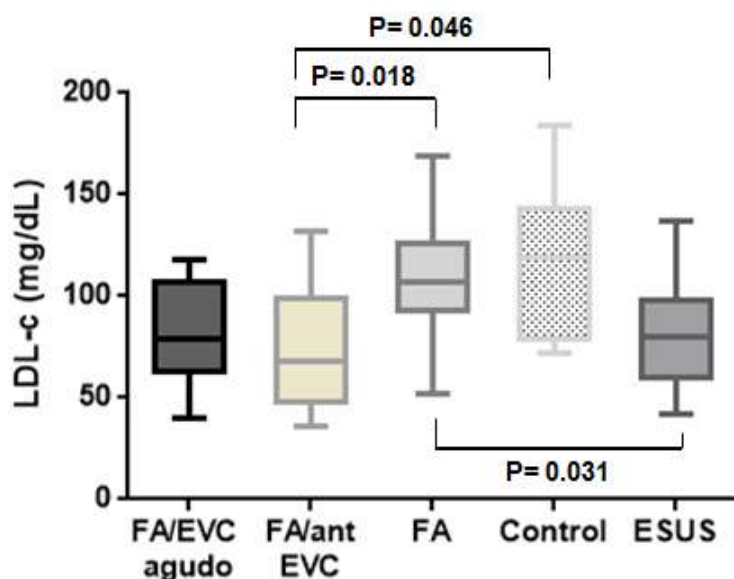


**Figura 10:** Gráfico comparativo del VPM entre los grupos de estudio.



Disminución en el colesterol total de los pacientes con FA en proceso de EVC agudo en comparación con los sujetos sanos (Figura 11).

Figura 11: Gráfico comparativo del colesterol total entre los grupos de estudio.

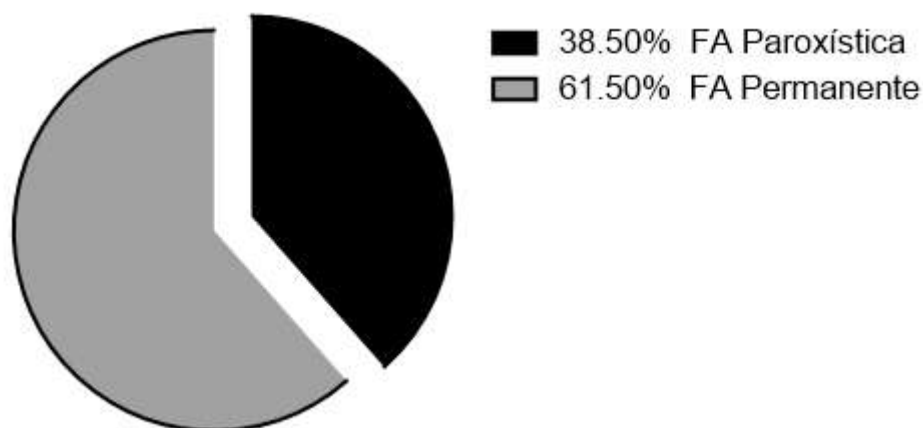


Incremento en las lipoproteínas de baja densidad en los grupos FA con/sin desarrollo de EVC en comparación con los grupos ESUS y control (Figura 12).

Figura 12: Gráfico comparativo del LDL-c entre los grupos de estudio.

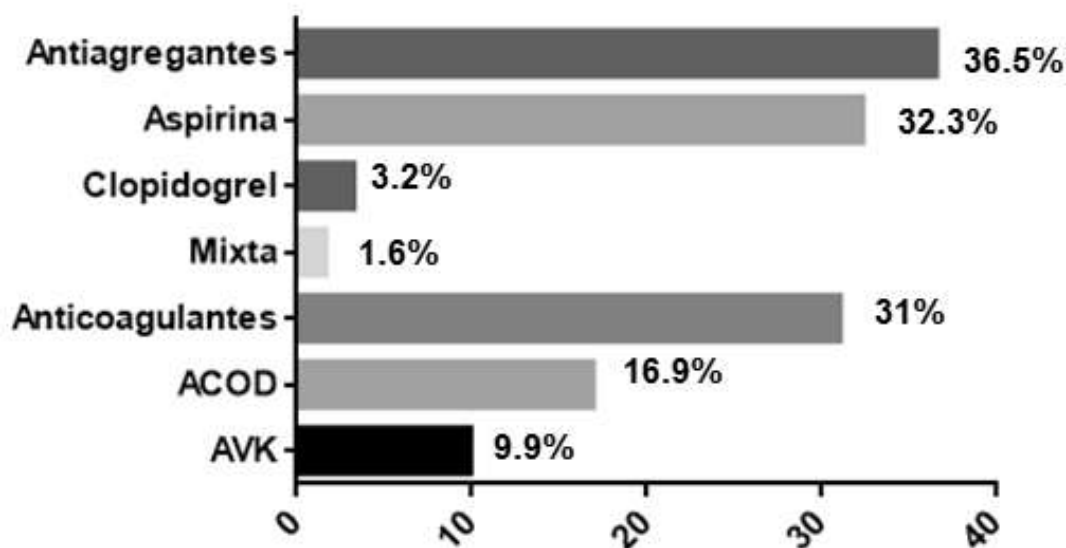
### Tipo de fibrilación auricular y tromboprolifaxis

De los pacientes con FA, el 61.5% presentó FA de tipo permanente y el 38.5% FA tipo paroxística (Figura 13).



**Figura 13:** Distribución de la población de acuerdo al tipo de FA.

El 31% del total de la población con FA se encontraba bajo tratamiento con anticoagulantes orales y el 36.5% con antiagregantes plaquetarios (Figura 14).



**Figura 14:** Tratamiento anticoagulante y antiagregante en FA. **AVK:** Antagonistas de la vitamina K (acenocumarina). **ACOD:** Anticoagulantes orales directos (ribaroxabán, dabigatrán, apixabán).

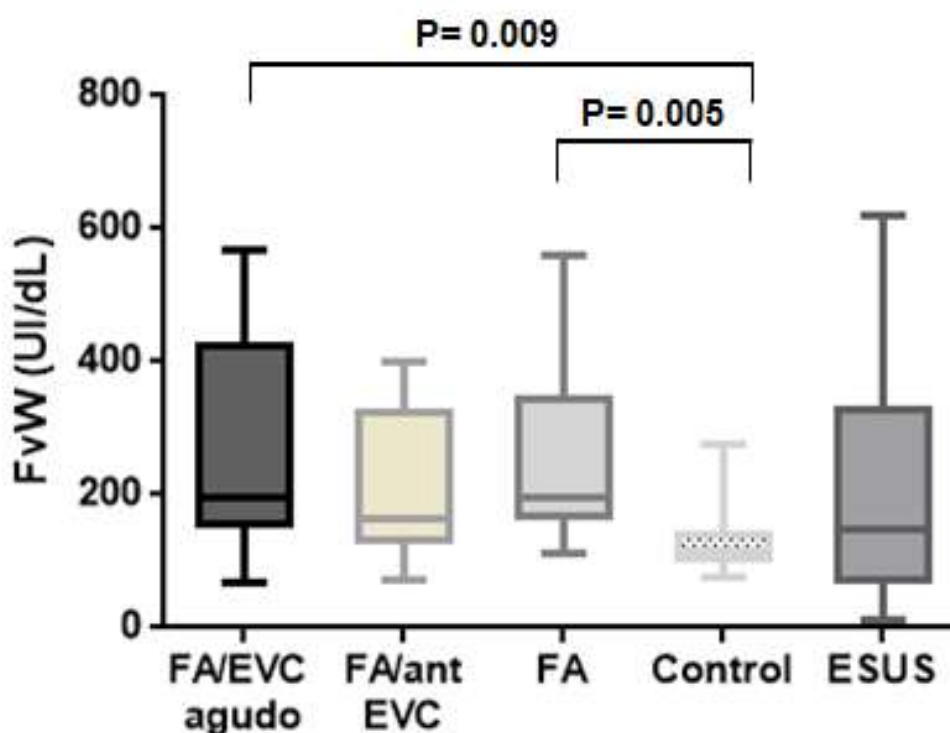
### Análisis de la concentración plasmática de FvW

Se observó un incremento en las concentraciones plasmáticas de FvW de los grupos con FA en comparación con los sujetos sanos (Figura 15).

**Tabla 6:** Análisis de la concentración plasmática de FvW entre los grupos de estudio.

Concentraciones plasmáticas de FvW (UI/dL)					
FA (n=33)	FA/EVC agudo (n=19)	FA/antEVC (n=20)	ESUS (n=29)	Control (n=23)	P
197.7 (111.8-558.3)	194 (66.9-566.9)	162.9 (71-400.7)	147.5 (12.7-621.6)	115 (75.9-275.1)	<b>0.000 (K)</b>

Datos expresados en mediana (valor mínimo – valor máximo). **FA:** Fibrilación auricular. **EVC:** Evento vascular cerebral. **ESUS:** Evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado. Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes (**K**). Se utilizó ANOVA de una vía post hoc Tukey para obtener una aproximación de la significancia entre grupos. Significancia  $P < 0.05$ .



**Figura 15:** Gráfico comparativo de las concentraciones plasmáticas de FvW entre los grupos de estudio.

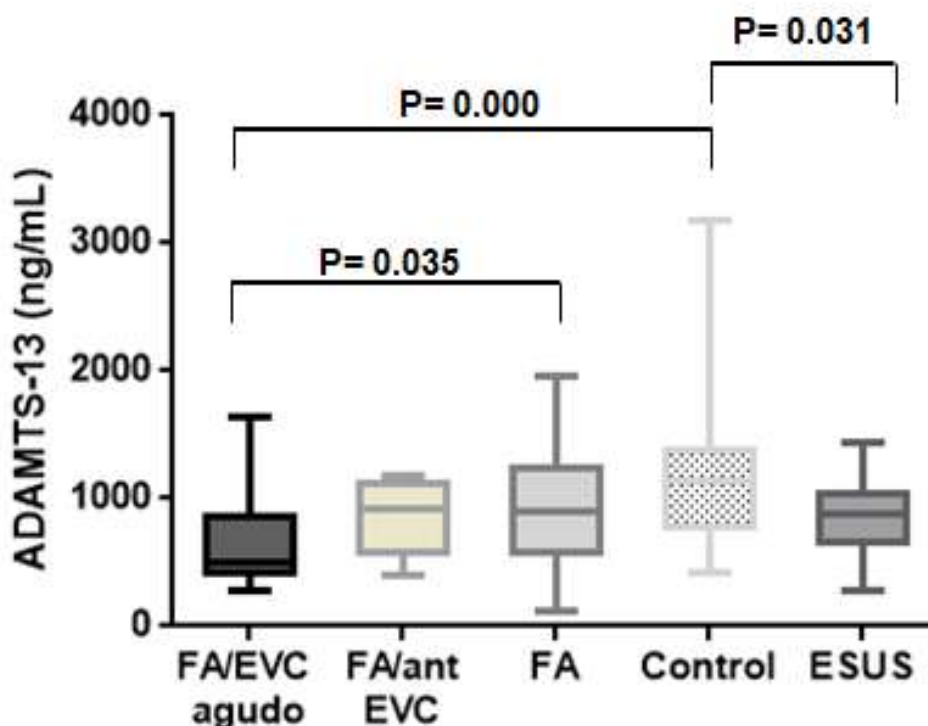
### Análisis de la concentración plasmática de ADAMTS-13

Se observó una disminución en las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 en los grupos con desarrollo de EVC (FA/EVC agudo y ESUS) en comparación con los grupos con ausencia de EVC (FA y control) (Figura 16).

**Tabla 7:** Análisis de la concentración plasmática de ADAMTS-13 por grupo de estudio.

Concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 (ng/mL)					
FA (n=33)	FA/EVC agudo (n=19)	FA/antEVC (n=20)	ESUS (n=29)	Control (n=23)	P
894.8 (116.7-1955.1)	500.9 (286-1647)	922.6 (399.5-1187.5)	884.1 (284.1-1443.2)	1146.7 (429.3-3176.7)	<b>0.000</b> <b>(K)</b>

Datos expresados en mediana (valor mínimo – valor máximo). **FA:** Fibrilación auricular. **EVC:** Evento vascular cerebral. **ESUS:** Evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado. Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes **(K)**. Se utilizó ANOVA de una vía post hoc Tukey para obtener una aproximación de la significancia entre grupos. Significancia  $P < 0.05$ .



**Figura 16:** Gráfico comparativo de las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 entre los grupos de estudio.

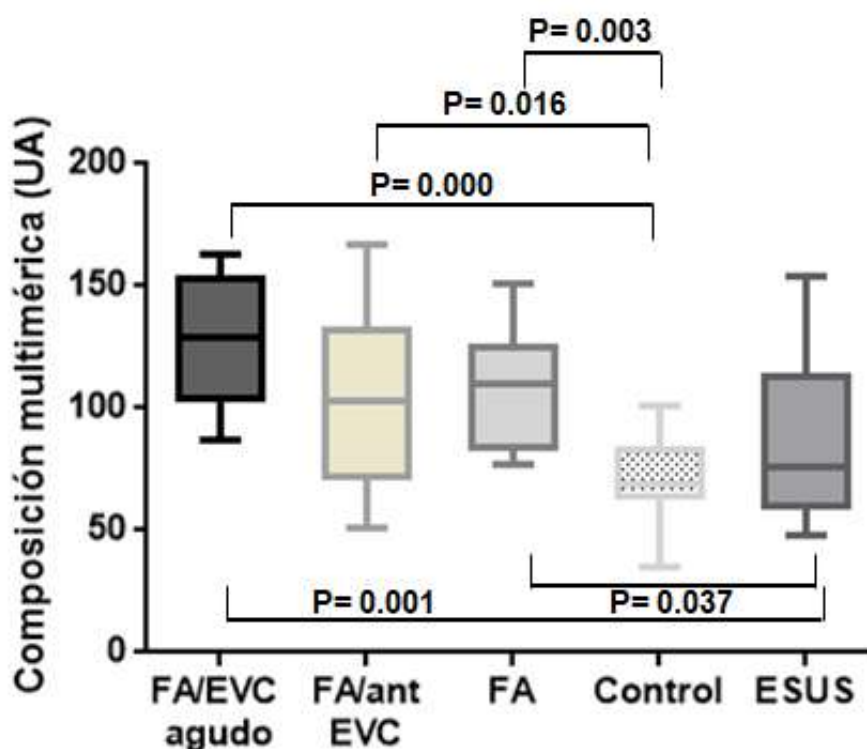
### Análisis de la estructura multimérica del Factor von Willebrand

Se observó un incremento en la composición multimérica del FvW evaluada mediante análisis densitométrico en los grupos de pacientes con FA en comparación con ESUS y sujetos sanos (Figura 17).

**Tabla 8:** Análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW (cargada en 15  $\mu$ L) por grupo de estudio.

Análisis densitométrico (UA)					
FA (n=33)	FA/EVC agudo (n=19)	FA/antEVC (n=20)	ESUS (n=29)	Control (n=23)	P
107.2 $\pm$ 22.3	129.77 $\pm$ 27.2	105.44 $\pm$ 35.7	84.7 $\pm$ 30.7	72.34 $\pm$ 18.4	<b>0.000 (A)</b>

Datos expresados en media  $\pm$  desviación estándar. **UA:** Unidades arbitrarias. **FA:** Fibrilación auricular. **EVC:** Evento vascular cerebral. **ESUS:** Evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado. Prueba de ANOVA de una vía post hoc Tukey. Significancia  $P < 0.05$ .



**Figura 17:** Gráfico comparativo del análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW entre los grupos de estudio.

El análisis densitométrico fue realizado sobre patrones multiméricos del FvW obtenidos en condiciones no desnaturalizantes mediante Western Blot cargados en 15  $\mu\text{L}$  para electroforesis, lo que promueve que al ser el mismo volumen las concentraciones de FvW utilizadas sean variadas (Tabla 9).

**Tabla 9:** Estadística descriptiva de las concentraciones en UI de FvW presentes en los patrones de bandeado utilizados en el análisis densitométrico.

Unidades internacionales de FvW presentes en los patrones de bandeado utilizados en el análisis densitométrico				
Media	Desviación estándar	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
0.0057	0.0036	0.0046	0.0003	0.0170

Por lo que se realizó un cálculo a partir de las concentraciones plasmáticas determinadas mediante ELISA para obtener patrones de bandeado con la misma concentración en UI de FvW (Figura 18).

**110  $\mu\text{L}$**  Volumen total utilizado en la preparación de la muestra en electroforesis de FvW

**20  $\mu\text{L}$**  Cantidad de plasma utilizado en el volumen total de la preparación de la muestra por paciente con [X] FvW UI/dL

[ ] = Concentración

$$[X] \text{ FvW UI} / 1 \text{ dL} = [X] \text{ FvW UI} / 100\,000 \mu\text{L}$$

$$\frac{([\text{Concentración de FvW obtenida por ELISA UI}] * (20))}{100\,000} = [\text{Y}] \text{ FvW UI presente en la preparación total de la muestra}$$

$$\frac{([\text{Y}] \text{ FvW UI presente en la preparación total de la muestra}) * (15)}{110} = [\text{Z}] \text{ FvW UI en los } 15 \mu\text{L} \text{ utilizados en la obtención de patrones de bandeado}$$

$$\frac{(0.0057 \text{ UI FvW}) * (15)}{[\text{Z}] \text{ FvW UI}} = \begin{array}{l} \text{Cantidad en } \mu\text{L a cargar} \\ \text{en electroforesis con} \\ 0.0057 \text{ UI de FvW} \end{array}$$

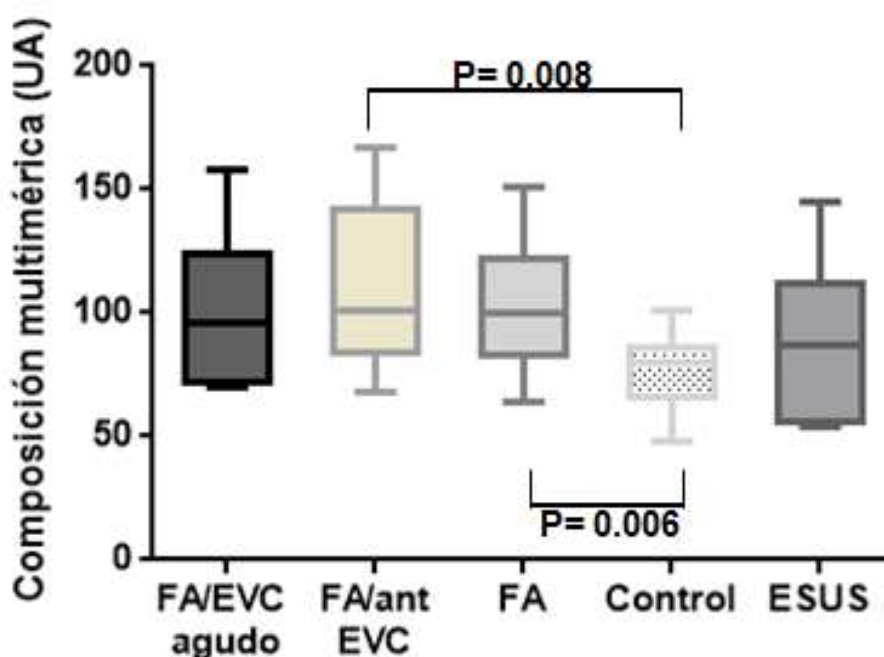
**Figura 18:** Cálculo para cargar la misma cantidad de FvW en electroforesis (0.0057 UI de FvW).

Al aplicar el cálculo, se observó un incremento en la composición multimérica del FvW evaluada mediante análisis densitométrico en los grupos de pacientes con FA y FA con antecedente de EVC en comparación con los sujetos sanos (Figura 19).

**Tabla 10:** Análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW (cargada en 0.0057 UI de FvW por paciente) por grupo de estudio.

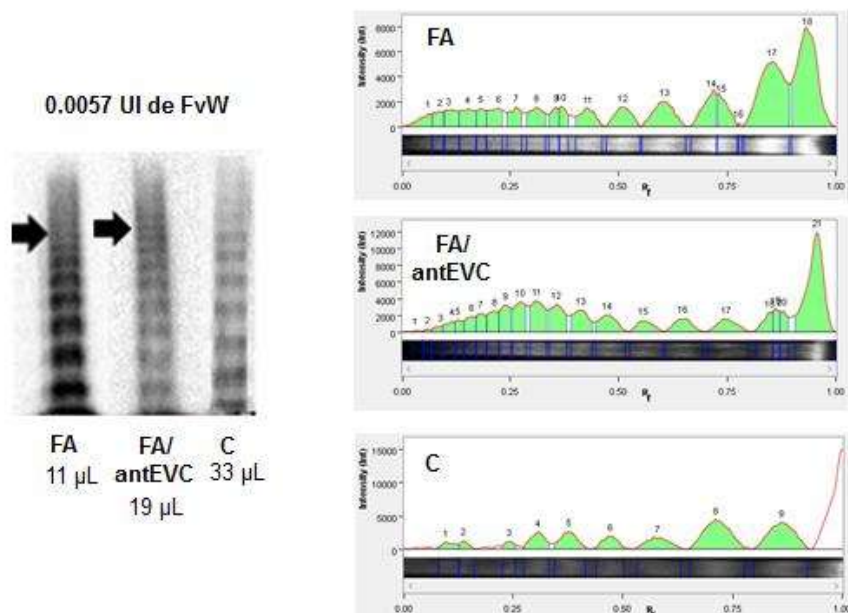
Análisis densitométrico (UA)					
FA (n=33)	FA/EVC agudo (n=19)	FA/antEVC (n=20)	ESUS (n=29)	Control (n=23)	P
104.11±24.8	105.05±31.5	109.21±33	90.6±33.4	76.6±13	<b>0.002 (A)</b>

Datos expresados en media ± desviación estándar. **UA:** Unidades arbitrarias. **FA:** Fibrilación auricular. **EVC:** Evento vascular cerebral. **ESUS:** Evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado. Prueba de ANOVA de una vía post hoc Tukey. Significancia P<0.05.



**Figura 19:** Gráfico comparativo del análisis densitométrico de la estructura multimérica de FvW con la misma cantidad de proteína entre los grupos de estudio.

En los grupos con fibrilación auricular se observó una marcada presencia de estructuras de alto peso molecular (MAPM) (Figura 20).



**Figura 20:** Análisis densitométrico de la estructura multimérica del FvW donde predomina la presencia marcada de estructuras de alto peso en los pacientes con FA.

Análisis de una paciente de 48 años, FA permanente, sin factores de riesgo, con EVC en el momento agudo y un mes después (Tabla 11).

**Tabla 11:** Tabla comparativa del FvW en EVC agudo y posterior al momento agudo.

Variable	EVC agudo	Un mes después	Estructura multimérica
Concentración FvW (UI/dL)	422.91	165.63	
Concentración ADAMTS13 (ng/mL)	929.7	827.44	
VPM (fL)	10.9	9.9	
Estructura multimérica (UA)	124.4	109.3	
µL Cargados en electroforesis	7.4	18.9	

**FvW:** Factor von Willebrand. **VPM:** Volumen plaquetario medio. **EVC:** Evento vascular cerebral. **UA:** Unidades arbitrarias.

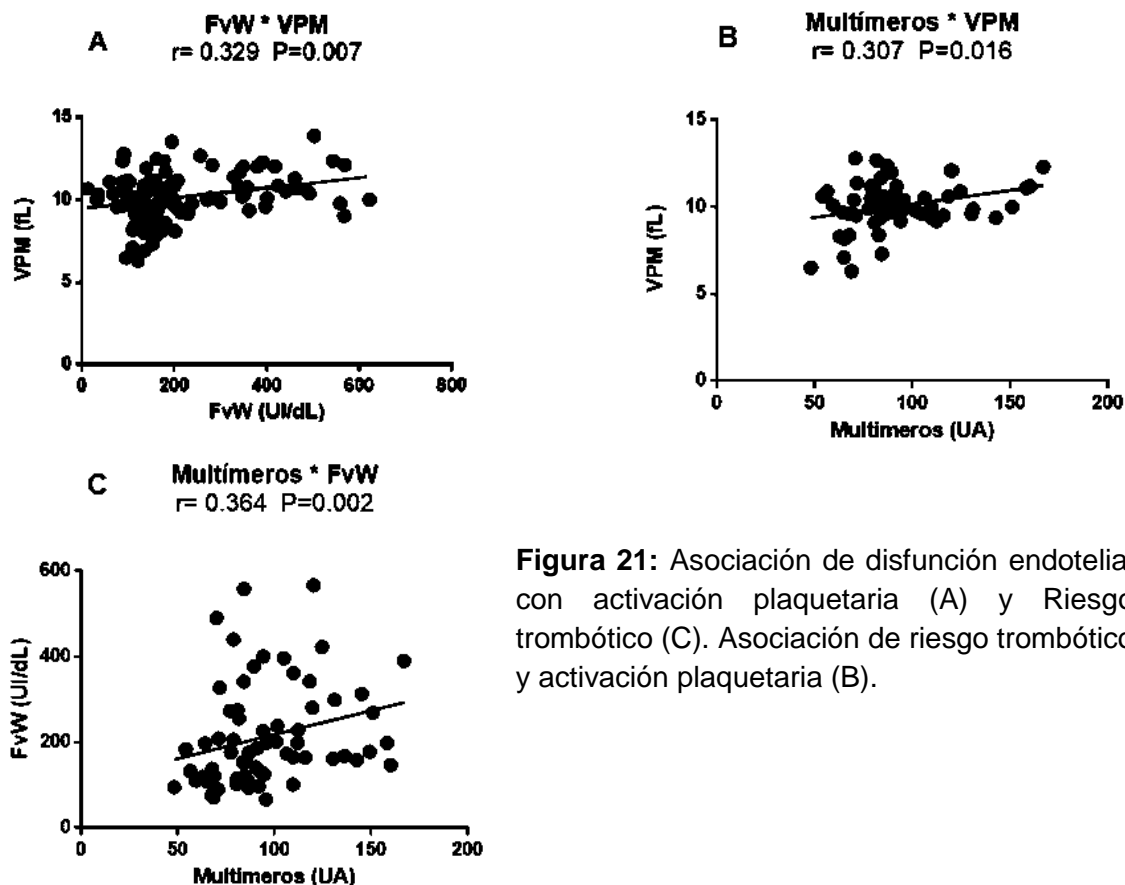
### Correlación de la concentración plasmática y composición multimérica de FvW con la concentración plasmática de ADAMTS-13

Se observó asociación de disfunción endotelial y riesgo trombótico en fibrilación auricular. Las estructuras multiméricas de alto peso molecular incrementan con las concentraciones elevadas de FvW, las concentraciones plasmáticas de FvW se elevan con la activación plaquetaria (Figura 21). No se observa relación con ADAMTS-13.

**Tabla 12:** Correlaciones entre FvW, VPM y ADAMTS-13.

Correlaciones entre biomarcadores								
	Multímeros FvW		FvW		VPM		ADAMTS13	
	Rho	P	Rho	P	Rho	P	Rho	P
<b>ADAMTS13</b>	0.072	0.661	-0.060	0.617	0.084	0.506	--	--
<b>Multímeros FvW</b>	--	--	0.364	<b>0.002</b>	0.307 (r)	<b>0.016</b>	0.072	0.661
<b>FvW</b>	0.364	<b>0.002</b>	--	--	0.329	<b>0.007</b>	-0.060	0.617

**FvW:** Factor von Willebrand. **VPM:** Volumen plaquetario medio. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho). Coeficiente de correlación de Pearson (r). Significancia  $P < 0.05$ .



**Figura 21:** Asociación de disfunción endotelial con activación plaquetaria (A) y Riesgo trombótico (C). Asociación de riesgo trombótico y activación plaquetaria (B).

### Análisis de las concentraciones de FvW y ADAMTS-13 de acuerdo al tipo de fibrilación auricular

El tipo de FA no influye en las concentraciones de los biomarcadores (Tabla 13).

**Tabla 13:** Análisis de ADAMTS-13 y FvW de acuerdo al tipo de FA.

Variable	Fibrilación auricular		P
	Paroxística (38.5%)	Permanente (61.5%)	
FvW (UI/dL)	238.5±105.4	270.7±151.7	0.765 (U)
ADAMTS-13 (ng/mL)	911±410.8	862.3±374.6	0.709 (T)
Análisis densitométrico (UA)	103.6±24.3	114.5±30.9	0.318 (T)

Datos expresados media  $\pm$  desviación estándar. **FvW:** Factor von Willebrand. **UA:** Unidades arbitrarias. Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes (**U**). Prueba T de Student para muestras independientes (**T**). Significancia  $P < 0.05$ .

Sin embargo, se muestra en el tipo de FA permanente una tendencia de concentraciones de FvW y composición multimérica de alto peso molecular ligeramente elevadas y concentraciones ligeramente disminuidas de ADAMTS-13.

### Análisis de la concentración plasmática y composición multimérica de FvW en pacientes con y sin tratamiento anticoagulante y antiagregante

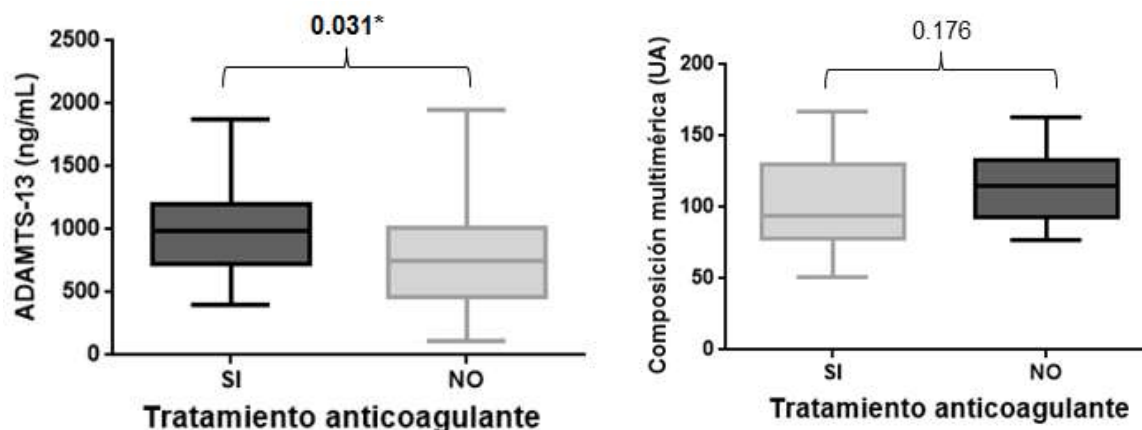
No se observaron diferencias en las concentraciones de FvW de acuerdo al tratamiento en la población total de FA (Tabla 14).

**Tabla 14:** Análisis de FvW y ADAMTS-13 de acuerdo al tratamiento en FA.

Variable	Tratamiento		P	Tratamiento		P
	Con anticoagulante (31%)	Sin anticoagulante (69%)		Con antiagregante plaquetario (36.5%)	Sin antiagregante plaquetario (63.5%)	
<b>FvW (UI/dL)</b>	242.3±132	242±129.7	0.995 (U)	263.6±137.2	244.6±134	0.471 (U)
<b>ADAMTS-13 (ng/mL)</b>	1012.5±413.5	783.4±401.6	<b>0.031 (T)</b>	849.4±407.2	933.9±419.4	0.440 (T)
<b>Composición multimérica del FvW (UA)</b>	103.5±34.1	114.9±24.7	0.176 (T)	115.5±27.5	106.3±30.1	0.289 (T)

Datos expresados media ± desviación estándar. **FvW:** Factor von Willebrand. **UA:** Unidades arbitrarias. Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes (**U**). Prueba T de Student para muestras independientes (**T**). Significancia P<0.05.

Sin embargo, se observó una disminución en las concentraciones de ADAMTS-13 en pacientes no anticoagulados, donde se muestra una tendencia en el incremento de estructuras multiméricas de alto peso molecular (Figura 22).



**Figura 22:** Disminución en las concentraciones de ADAMTS-13 y tendencia en el incremento de MAPM en pacientes con FA no anticoagulados.

### Correlación de la concentración plasmática y composición multimérica de FvW en relación al riesgo de EVC en FA

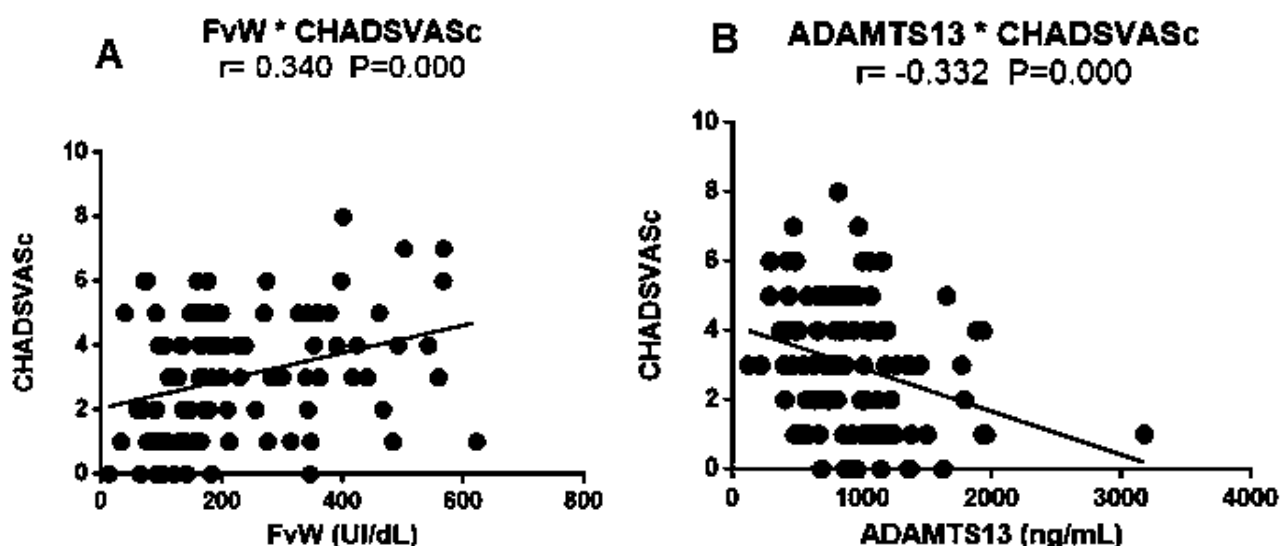
Relación de los biomarcadores con la escala de estratificación de riesgo de EVC en FA (CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC) (Tabla 15).

**Tabla 15:** Análisis de FvW y ADAMTS-13 con la escala de estratificación de riesgo de EVC en FA.

Correlaciones entre biomarcadores con el riesgo de EVC en FA						
	FvW		Multímeros FvW		ADAMTS-13	
	Rho	P	Rho	P	Rho	P
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> VASc	0.340	0.000	0.197	0.135	-0.332	0.000

**FvW:** Factor von Willebrand. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho). Significancia P<0.05.

Se observó un incremento en las concentraciones del FvW y disminución de las concentraciones de ADAMTS-13 con el aumento del puntaje determinado por la escala de estratificación de riesgo de EVC en FA CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC (Figura 23).



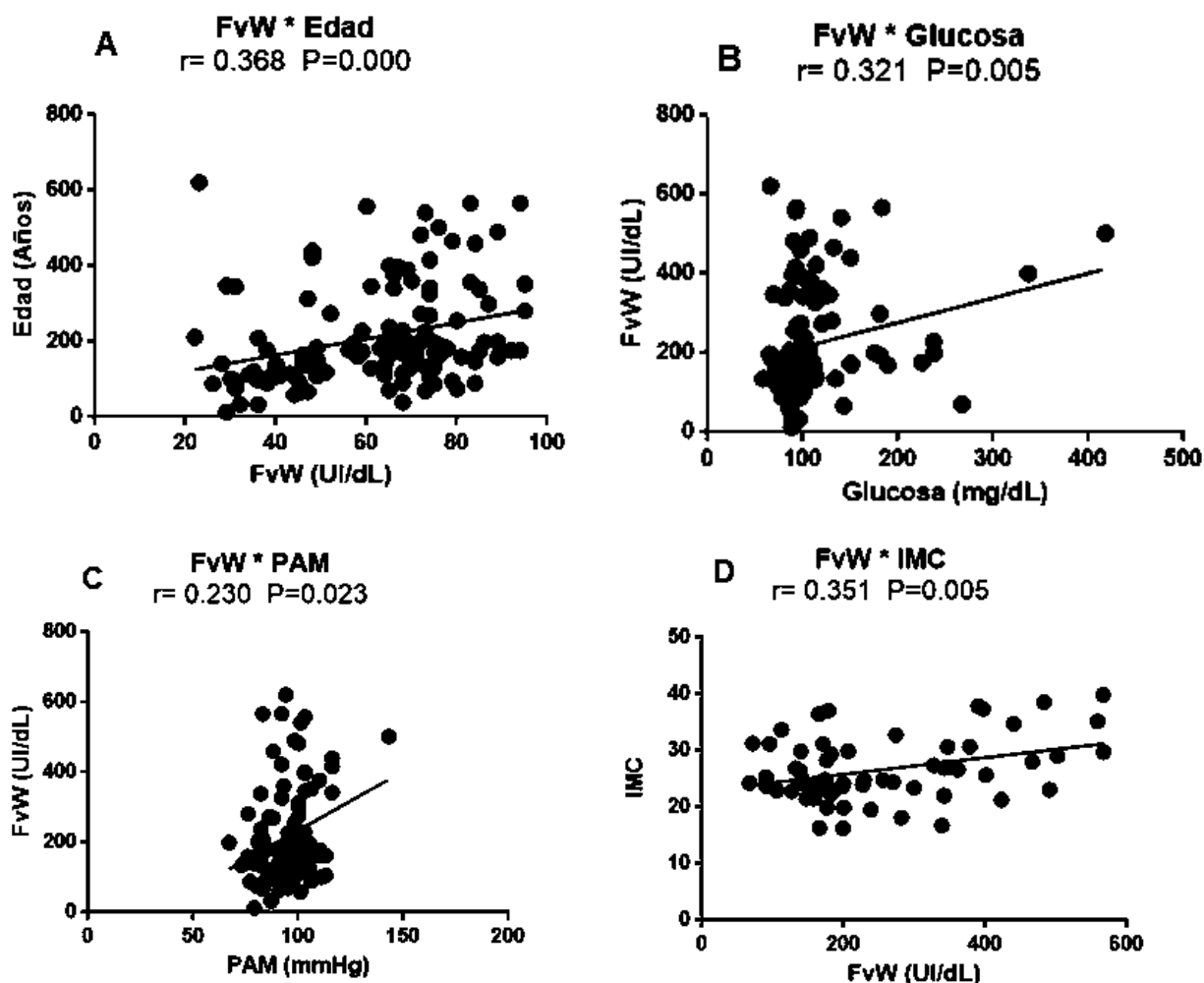
**Figura 23:** Incremento de las concentraciones de FvW (A) y disminución en las concentraciones de ADAMTS13 (B) conforme incrementa el riesgo de EVC en FA.

Factores con la edad, la hipertensión arterial, la hiperglicemia y la obesidad tienen efecto sobre el endotelio e incrementan las concentraciones del FvW (Figura 24).

**Tabla 16:** Análisis del FvW con factores clínicos.

Correlaciones entre biomarcadores FvW con factores clínicos								
	Edad		IMC		Glucosa		PAM	
	Rho	P	Rho	P	Rho	P	Rho	P
FvW	0.368	<b>0.000</b>	0.351	<b>0.005</b>	0.321	<b>0.005</b>	0.230	<b>0.023</b>

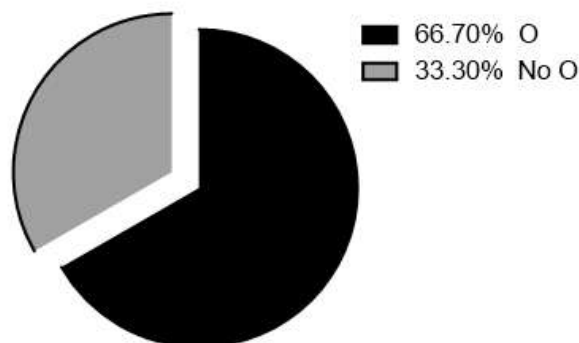
**FvW:** Factor von Willebrand. **IMC:** Índice de masa corporal. **PAM:** Presión arterial media. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho). Significancia  $P < 0.05$ .



**Figura 24:** Incremento de las concentraciones de FvW con diversos factores de riesgo cardiovascular: edad (A), hiperglicemia (B), hipertensión arterial (C) y sobrepeso/obesidad (D).

### Análisis de las concentraciones de FvW de acuerdo al grupo sanguíneo

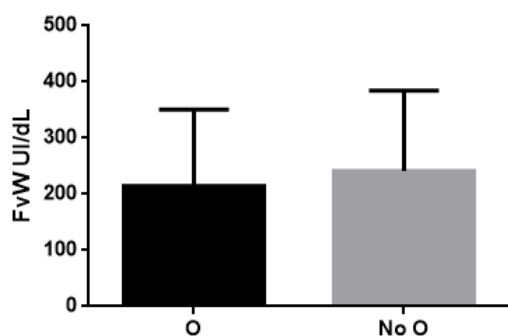
El 66.7% de los pacientes tienen tipo sanguíneo O y el 33.3% tienen tipo sanguíneo No-O (Figura 25).



**Figura 25:** Distribución de la población por grupo sanguíneo.

Grupo sanguíneo			
Variable	Tipo O (66.7%)	Tipo No - O (33.3%)	P
FvW (UI/dL)	214.9±134.7	241.8±144.9	0.354 (U)
ADAMTS-13 (ng/mL)	921.8±417.3	996.2±527.6	0.447 (T)
Análisis densitométrico (UA)	98.7±31.1	109.8±31.9	0.151 (T)

**Tabla 17:** Análisis de FvW y ADAMTS-13 de acuerdo al grupo sanguíneo. Datos expresados media ± desviación estándar. **FvW:** Factor von Willebrand. **UA:** Unidades arbitrarias. Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes (**U**). Prueba T de Student para muestras independientes (**T**). Significancia  $P < 0.05$ .



No se observaron diferencias en las concentraciones de FvW de acuerdo al grupo sanguíneo, sin embargo se muestra la tendencia de disminución de las mismas tal como se describe en la literatura (Figura 26). No hay diferencias en las concentraciones de ADAMTS-13 ni en la estructura multimérica del FvW de acuerdo al grupo sanguíneo.

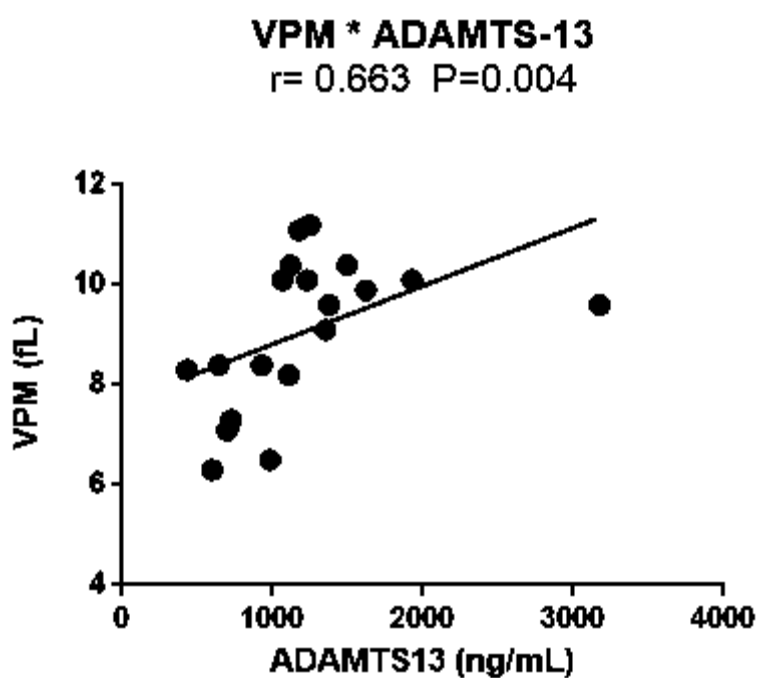
**Figura 26:** Gráfico que muestra la tendencia de concentraciones de FvW ligeramente menores en el grupo sanguíneo tipo O.

En sujetos sanos, se observó una correlación del ADAMTS-13 con VPM (Figura 27).

**Tabla 18:** Análisis de ADAMTS-13 y VPM en sujetos sanos.

Correlación de Spearman (Rho)	VPM
ADAMTS-13	0.663 P= 0.004

**VPM:** Volumen plaquetario medio. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho). Significancia P<0.05.



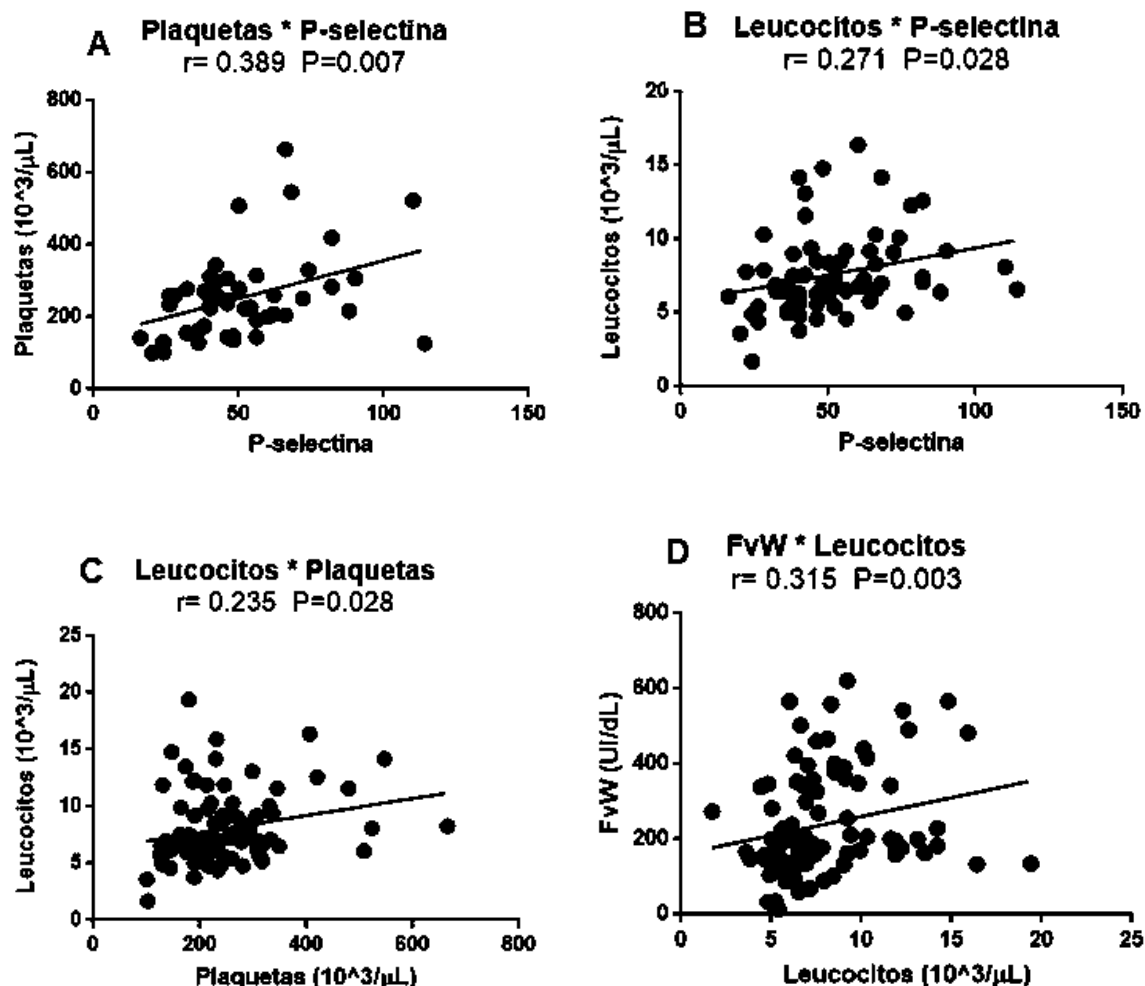
**Figura 27:** Gráfico que muestra el incremento en las concentraciones de ADAMTS-13 conforme al incremento en el VPM en sujetos sanos.

Se observó una relación entre parámetros hemostáticos e inmunológicos en fibrilación auricular (Figura 28).

**Tabla 19:** Análisis de FvW, P-selectina y cuenta de plaquetas y leucocitos

Correlaciones entre biomarcadores con factores bioquímicos						
	FvW		Plaquetas		P-selectina	
	Rho	P	r	P	r	P
Leucocitos	0.315	<b>0.003</b>	0.235	<b>0.028</b>	0.271	<b>0.028</b>
Plaquetas	0.098	0.428	--	--	0.389	<b>0.007</b>

**FvW:** Factor von Willebrand. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho). Coeficiente de correlación de Pearson (r). Significancia  $P < 0.05$ .



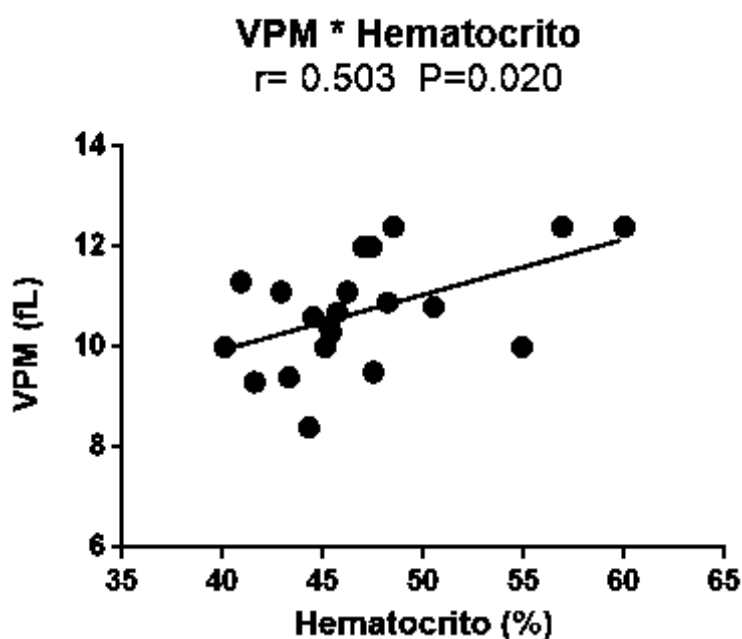
**Figura 28:** Asociación de plaquetas (A) y leucocitos (B) con P-selectina y asociación del incremento en las concentraciones de FvW con el incremento en la cuenta de células blancas (D).

En ESUS, se observó una correlación del VPM con hematocrito (Figura 29).

**Tabla 20:** Análisis de VPM y hematocrito en ESUS.

Correlación de Pearson (r)	VPM
Hematocrito	0.503 P= 0.020

**VPM:** Volumen plaquetario medio. Coeficiente de correlación de Pearson (r). Significancia P<0.05.



**Figura 29:** Gráfico que muestra la relación de incremento de activación plaquetaria conforme incrementa el hematocrito.

## RESUMEN DE RESULTADOS

### Objetivo 1:

**Integrar una cohorte de pacientes y obtener datos clínicos, demográficos y de laboratorio.**

- Se incluyeron en este estudio un total de 124 pacientes distribuidos en los siguientes grupos: FANV (n=33), FANV/EVC agudo (n=19), FANV y antecedente de EVC (n=20), ESUS (n=29) y sujetos sanos (n=23).
- Con una edad promedio de  $61 \pm 18$  años con un mínimo de 22 y un máximo de 95. El 51.5% de los pacientes tenía HAS, el 26.7% DM y el 53.3% sobrepeso/obesidad.
- Se observaron diferencias en la edad ( $P=0.000$ ), la glucosa ( $P=0.002$ ), el colesterol ( $P=0.023$ ) y activación plaquetaria ( $P=0.006$ ) entre los grupos de estudio.

### Objetivo 2:

**Comparar las concentraciones plasmáticas y estructura multimérica de FvW y concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 en pacientes con EVC asociado a FA (proceso agudo y posterior a proceso agudo), pacientes con EVC sin FA (ESUS), pacientes con FA sin desarrollo de EVC y sujetos aparentemente sanos.**

- Se observó un incremento en la composición multimérica ( $P=0.006$ ) y la concentración plasmática ( $P=0.005$ ) de FvW en los grupos con FA en comparación con los sujetos sanos
- Se observó una disminución en las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 en los grupos con desarrollo de EVC (FA/EVC agudo ( $P=0.000$ ) y ESUS ( $P=0.031$ )) en comparación con los grupos con ausencia de EVC (FA ( $P=0.035$ ) y control).
- Se observaron estructuras de alto peso molecular (MAPM) con marcada presencia en los grupos con fibrilación auricular

### Objetivo 3:

**Correlacionar la concentración plasmática y composición multimérica de FvW con la concentración plasmática de ADAMTS-13.**

- No se observó relación de las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 con las concentraciones y estructura multimérica de FvW.

**Objetivo 4:**

**Correlacionar la concentración plasmática de FvW y ADAMTS-13 y la composición multimérica de FvW con riesgo de EVC en FA.**

- Se observó un incremento en las concentraciones del FvW ( $P=0.000$ ) y disminución de las concentraciones de ADAMTS-13 ( $P=0.000$ ) con el aumento del puntaje determinado por la escala de estratificación de riesgo de EVC en FA CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASC.

**Objetivo 5:**

**Comparar concentración plasmática y composición multimérica de FvW en pacientes con y sin tratamiento anticoagulante y antiagregante.**

- El 31% de los pacientes se encontraba bajo tratamiento con anticoagulantes orales y el 36.5% con antiagregantes plaquetarios.
- No se observaron diferencias en la concentración plasmática y estructura multimérica del FvW de acuerdo a la presencia o ausencia de tratamiento anticoagulante o antiagregante.

**Objetivo 6:**

**Correlacionar la concentración plasmática y estructura multimérica de FvW con datos clínicos y bioquímicos.**

- Se observó un incremento en las concentraciones de FvW con la edad ( $P=0.000$ ), PAM ( $P=0.023$ ), la hiperglicemia ( $P=0.005$ ) y el IMC ( $P=0.005$ ).
- No se observaron diferencias en las concentraciones de FvW de acuerdo al grupo sanguíneo.
- Se observó una correlación del ADAMTS-13 con VPM ( $P=0.004$ ) en sujetos sanos.
- Se observó una asociación de FvW ( $P=0.003$ ), plaquetas ( $P=0.028$ ) y P-selectina ( $P=0.028$ ) con leucocitos, así como plaquetas con P-selectina ( $P=0.007$ ).
- Se observó una asociación del VPM con hematocrito ( $P=0.020$ ) en ESUS.

## DISCUSIÓN

Algunos parámetros clínicos y bioquímicos mostraron diferencias entre los grupos de estudio sin embargo en su mayoría se observó entre ellos un comportamiento homogéneo. La disparidad observada en la edad entre los grupos es consecuente a la elevada prevalencia de fibrilación auricular en edad avanzada en comparación con el rango de edad relativamente joven de los pacientes con evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado (22)(29). El incremento reflejado en la cantidad de leucocitos en los pacientes con FA y EVC en proceso agudo en comparación con los pacientes con EVC posterior al proceso agudo y sujetos sanos es secundario al proceso inflamatorio consecuente al daño producido en el tejido cerebral por la reducción del flujo sanguíneo que conlleva a neurotoxicidad inducida por la estimulación excesiva de los receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato (excitotoxicidad), estrés oxidativo, lesión microvascular, disfunción de la barrera hematoencefálica e inflamación post-isquémica (36).

Las diferencias observadas en los factores bioquímicos como la glucosa, el colesterol y las lipoproteínas de baja densidad en los grupos de pacientes en comparación con los sujetos sanos se relacionan con la presencia de comorbilidades asociadas en los pacientes con FA entre los que se encontró un 26% con Diabetes mellitus y un 53% en estado de sobrepeso/obesidad.

Los pacientes con evento vascular cerebral embólico de origen indeterminado (ESUS) mostraron un incremento en el volumen de glóbulos rojos en relación al total de la sangre en comparación con los grupos de EVC de origen cardioembólico y los sujetos sanos, estudios recientes que analizaron la composición histológica del trombo de muestras extraídas mediante el tratamiento endovascular del EVC agudo en ESUS mostraron que la mayoría de los trombos son ricos en eritrocitos o de composición mixta y en menor porcentaje trombos ricos en plaquetas (29)(32). En los pacientes ESUS se observó además una asociación de la activación plaquetaria (VPM) con el incremento de eritrocitos en sangre (% hematocrito), se ha descrito recientemente la participación de los eritrocitos en hemostasia y trombosis mediante cambios en la cantidad de células, por ejemplo el hematocrito al modular la reología del flujo sanguíneo a través de la viscosidad o cambios en la célula misma mediante deformabilidad eritrocitaria, agregación, expresión de proteínas de adhesión y fosfatidilserina, liberación de microvesículas extracelulares y hemólisis. De forma adicional, los eritrocitos promueven la adhesión y agregación plaquetaria mediante la liberación de ADP y Tromboxano A<sub>2</sub>, forman agregados con plaquetas a través de fibrinógeno y

d11b $\beta$ III y se involucran en la modulación de las concentraciones de FvW a través del sistema del grupo sanguíneo ABO (37)(38).

Se observó también un incremento en el volumen plaquetario medio en los pacientes con FA y ESUS en comparación con los sujetos sanos, lo que sugiere activación plaquetaria en estos grupos ya que este proceso involucra una serie de cambios en la ultraestructura plaquetaria e incremento de tamaño, el VPM es además una herramienta útil de evaluación de activación plaquetaria, de costo reducido y de fácil acceso en el laboratorio (39).

La concentración plasmática de FvW representa un biomarcador de disfunción endotelial y su incremento en forma de estructuras de alto peso molecular un factor de riesgo de trombosis (6). Se observó un incremento en la concentración plasmática y estructura multimérica de alto peso molecular de FvW en el grupo con FA en comparación con los sujetos sanos. La fibrilación auricular es una arritmia cardíaca cuya fisiopatología involucra diversos factores en conjunto que tienen efecto sobre el endotelio, observamos también en estos pacientes una asociación del incremento en las concentraciones de FvW con activación plaquetaria ya que el FvW tiene la capacidad de desencadenar activación plaquetaria y a su vez al activarse las plaquetas liberan FvW, además se observó que al elevarse las concentraciones plasmáticas de FvW incrementa también la presencia de estructuras de alto peso molecular. Se observaron en los pacientes con FA y EVC agudo concentraciones elevadas del FvW y concentraciones disminuidas de ADAMTS-13, durante el proceso inflamatorio en fase aguda se incrementa la permeabilidad vascular, la diapédesis de leucocitos y la acumulación de FvW en el espacio extravascular (6) ya que además de reclutar plaquetas tiene la capacidad de unirse a leucocitos por medio de integrinas  $\beta$ 2 en la secuencia LLG (Leucina-Leucina-Glicina) de los dominios A2 y D3 (9)(40). Además, interleucinas inflamatorias como IL6 promueven una baja actividad de ADAMTS-13 con la finalidad de incrementar la presencia de estructuras multiméricas de alto peso molecular del FvW que en conjunto con P-selectina participan activamente en el reclutamiento y extravasación eficiente de leucocitos inducido por plaquetas (7)(6).

Se observó una asociación de las concentraciones elevadas de FvW con un incremento en la cuenta de leucocitos y una asociación tanto de leucocitos como plaquetas con P-selectina, que es una molécula de adhesión celular que media la interacción de células endoteliales con leucocitos y que es además un biomarcador de activación plaquetaria ya que está ausente en la membrana plasmática de la plaqueta en reposo (17). En un estudio realizado en 2018 se observó una correlación del incremento en las concentraciones de P-selectina soluble con la estasis sanguínea debida a la presencia de trombo intracavitario

en la orejuela de la aurícula izquierda en pacientes con fibrilación auricular no valvular (41)(42).

El mecanismo en la trombogénesis en FA es multifactorial, diversos estudios mencionan la importancia del equilibrio en las concentraciones de FvW/ADAMTS-13 ya que las alteraciones tal como concentraciones elevadas de FvW y disminución de ADAMTS-13 se asocian con riesgo elevado en el desarrollo del primer EVC isquémico y elevada recurrencia y gravedad (43)(6)(7). Se observaron concentraciones disminuidas de ADAMTS-13 en los grupos con desarrollo de EVC (FA/EVC agudo y ESUS) en comparación con los grupos con ausencia de EVC (FA y control), sin embargo no se observaron asociaciones con el incremento en la presencia de estructuras de alto peso molecular del FvW. En los sujetos sanos se observó una asociación entre el volumen plaquetario medio y las concentraciones de ADAMTS-13, los gránulos  $\alpha$  plaquetarios contienen ADAMTS-13 (16) y un artículo de 2004 reporta la expresión de ADAMTS-13 en plaquetas de seis voluntario sanos (44).

Se observó una asociación del incremento en la concentración plasmática de FvW y la disminución en las concentraciones de ADAMTS-13 con el incremento en el riesgo de EVC en FA determinado por la escala de estratificación de riesgo CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc, el FvW se ha propuesto como un factor de riesgo de EVC en FA que debería ser considerado en las escalas de estratificación de riesgo (45)(20) y el valor predictivo de la escala CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>VASc ha sido considerado eficiente en la estratificación del riesgo de EVC con presencia y ausencia de fibrilación auricular ya que aunado al estado protrombótico que promueven las alteraciones hemodinámicas en FA y tal como se considera en las escalas de estratificación de riesgo, se encuentran las comorbilidades asociadas que perjudican el endotelio por medio de diferentes vías y que favorecen la liberación de FvW de la célula endotelial como fue observado en este estudio con factores como la edad, la hiperglucemia y el sobrepeso/obesidad. La hiperglucemia promueve el desarrollo de estrés oxidativo y daño vascular como consecuencia del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la acumulación de sorbitol y fructosa a través de la vía del poliol, el incremento en la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), activación de la proteína cinasa C (PKC) y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) (46). Otro factor de riesgo es la obesidad, que es una condición heterogénea que tiene implicaciones metabólicas y cardiovasculares. La grasa ectópica se define como el exceso de tejido adiposo localizado fuera de los depósitos de tejido adiposo clásicos y se categoriza en base a su ubicación o efecto que puede ser local o sistémico, el efecto cardiaco es local y se clasifica en tejido adiposo paracárdico y epicárdico que incluye depósitos entre el miocardio y el pericardio visceral. El exceso de grasa epicárdica

promueve la infiltración de adipocitos en la aurícula, lo que conlleva a la remodelación estructural y dilatación de esta, inflamación, disfunción endotelial y generación de trombos (47)(48).

## CONCLUSIONES

1. La disminución en las concentraciones de ADAMTS13 y el incremento en las concentraciones de FvW representan un factor de riesgo de EVC en FA al asociarse con la escala de estratificación de riesgo CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc.
2. A pesar de que se observó una disminución en las concentraciones plasmáticas de ADAMTS-13 en los grupos con desarrollo de EVC en comparación con los grupos con ausencia de EVC, no se observó correlación con el incremento de estructuras de alto peso molecular del FvW.
3. Se observaron estructuras de alto peso molecular (MAPM) en los grupos con fibrilación auricular con EVC agudo y también en aquellos con antecedente de EVC por lo cual puede inferirse que la presencia de MAPM no está asociada al proceso inflamatorio agudo.
4. La estrategia actual de tromboprolifaxis en FA no muestra acción sobre las concentraciones del FvW.
5. El estudio tanto de la concentración plasmática como de la identificación de MAPM en conjunto con la escala CHA<sub>2</sub>S<sub>2</sub>VASc puede permitir de manera más certera la identificación de pacientes con FA en riesgo de desarrollar EVC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus.* 2011;9(2):s3–8.
2. Lenting P, Christophe O. von Willebrand factor biosynthesis , secretion , and clearance : connecting the far ends. *Blood.* 2015;125(13):2019–29.
3. Muñoz G, Viveros ME, Areán C, Vega E, López S, Gómez A. Von Willebrand Factor Plasma Levels Variability In Nonvalvular Atrial Fibrillation. *J Atriall Fibrillation.* 2015;7(4):99–105.
4. Stocksclaeder M, Schneppenheim R, Budde U. Update on von Willebrand factor multimers : focus on high- molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014;25:206–16.
5. Ruggeri Z. The role of von Willebrand Factor in thrombus formation. *Thromb Res.* 2007;120:S5–9.
6. Buchtele N, Schwameis M, Gilbert JC, Schörghofer C, Jilma B. Targeting von Willebrand Factor in Ischaemic Stroke : Focus on Clinical Evidence. *Thromb Haemost.* 2018;118:959–78.
7. Stegner D, Nieswandt B. Size does matter : VWF in MI. *Blood.* 2012;120(26):5096–8.
8. Haberichter SL. Perspectives von Willebrand factor propeptide : biology and clinical utility. *Blood.* 2015;126(15):1753–62.
9. Gragnano F, Sperlongano S, Golia E, Natale F, Bianchi R, Crisci M, et al. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation : From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm.* 2017;1–13.
10. Ledford-kraemer MR. Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am J Hematol.* 2010;85(April):510–4.
11. Crawley J, Groot R, Luken M. Circulating ADAMTS13 – von Willebrand factor complexes : an enzyme on demand. *J Thromb Haemost.* 2009;7:2085–7.
12. Rieger M, Ferrari S, Hovinga JAK, Konetschny C, Herzog A, Koller L, et al. Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies ( TMA ). *Thromb Haemost.* 2006;95(212):220.
13. Franchini M, Crestani S, Frattini F, Sissa C, Bonfanti C. ABO blood group and von Willebrand factor: Biological implications. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(9):1273–6.
14. Mckinnon TAJ, Chion ACK, Millington AJ, Lane DA, Laffan MA. N-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13. *Blood.* 2008;111(6):3042–50.
15. Sakariassen KS, Orning L, Turitto VT. The impact of blood shear rate on arterial thrombus formation. *Futur Sci OA.* 2015;1(4):FSO30.
16. Zhou J, Li Y, Chien S. Shear Stress – Initiated Signaling and Its Regulation of Endothelial Function. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2014;34:2191–8.
17. Bermejo E. Plaquetas. *Hematología.* 2017;21:10–8.
18. Casa LDC, Deaton DH, Ku DN. Role of high shear rate in thrombosis. *J Vasc Surg* [Internet]. 2015;61(4):1068–80. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2014.12.050>
19. Meyer SF De, Stoll G, Wagner DD, Kleinschnitz C. von Willebrand Factor An Emerging Target in Stroke Therapy. *Stroke*. 2012;43:599–606.
  20. García-fernández A, Roldán V, Rivera-caravaca JM, Hernández-romero D, Valdés M, Vicente V, et al. Does von Willebrand factor improve the predictive ability of current risk stratification scores in patients with atrial fibrillation? *Nat Publ Gr [Internet]*. 2017;(October 2016):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41565>
  21. Weymann A, Sabashnikov A, Ali-hasan-al-saegh S, Baker WL, Biondizoccai G, Dohmen PM. Predictive Role of Coagulation, Fibrinolytic, and Endothelial Markers in Patients with Atrial Fibrillation, Stroke, and Thromboembolism: A Meta-Analysis, Meta-Regression, and Systematic Review. *Med Sci Monit Basic Res*. 2017;23:97–140.
  22. Cea-calvo L, Redón J, Lozano J V, Fernández-pérez C, Martí-canales JC. Prevalencia de fibrilación auricular en la población española de 60 o más años de edad . Estudio PREV-ICTUS. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60(6):616–24.
  23. González-Hermosillo JA, Márquez MF, Ocampo-Peña S. Diseño de un registro de fibrilación auricular y riesgo embólico en México: CARMEN-AF. *Arch Cardiol México [Internet]*. 2017;87(1):5–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1405994016301057%0Ahttps://authors.elsevier.com/offsetprints/ACMX314/fa6b722bee87df7db2415bd47b760e9b>
  24. Camm AJ, Kirchhof P, Gregory L, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2010;31:2369–429.
  25. Pérez-copete J, Esteve-pastor MA, Roldán V, Valdés M. Escalas de evaluación del riesgo tromboembólico y hemorrágico en la fibrilación auricular. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2016;16(A):25–32.
  26. Kaski JC, Arrebola-Moreno AL. Inflamación y trombosis en la fibrilación auricular. *Rev Española Cardiol*. 2011;64(7):551–3.
  27. Guindo J, Martínez M, Martínez A, Duran I, Tornos P. Evaluación de riesgo tromboembólico y hemorrágico de los pacientes con fibrilación auricular. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(C):9–13.
  28. Cantú-brito C, Flores-Silva F. Enfermedad vascular cerebral y fibrilación auricular no valvular. *Rev Urug Cardiol*. 2015;30(3):357–63.
  29. Hart RG, Catanese L, Perera KS, Ntaios G, Connolly SJ. Embolic Stroke of Undetermined Source A Systematic Review and Clinical Update. *Stroke*. 2017;867–72.
  30. Gladstone D, Spring M, Dorian P, Panzov V, Thorpe K, Hall J, et al. Atrial Fibrillation in Patients with Cryptogenic Stroke. *N ENGL J MED*. 2014;370(26):2467–77.
  31. Sinha A, Diener H, Morillo CA, Sanna T. Cryptogenic Stroke and underlying Atrial Fibrillation ( CRYSTAL AF ): Design and rationale. *Am Heart J [Internet]*. 2010;160(1):36–41.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2010.03.032>
  32. Molina-Seguín J, Vena A, Colas-Campanas L, Benalbdelhak L, Purroy F. A systematic review of the characteristics and prognosis of subjects who

- suffer an embolic stroke of undetermined source. *REV NEUROL*. 2018;66:325–30.
33. Trejo C. Anticoagulantes : Farmacología , mecanismos de acción y usos clínicos. *Cuad Cir*. 2004;18:83–90.
  34. Seguel M. NUEVOS ANTICOAGULANTES ORALES EN FIBRILACIÓN AURICULAR. *Revi Med Clín Las Condes* [Internet]. 2015;26(2):223–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.04.011>
  35. Lopez-castaneda S, Valencia-herna I, Areal C, Godí D, Viveros-sandoval ME. Von Willebrand Factor : Multimeric Structure and Functional Activity in Patients With Atrial Fibrillation With and Without Oral Anticoagulation. *Clin Appl Thromb*. 2017;1–8.
  36. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke : therapeutic approaches. *J Transl Med*. 2009;7(97):1–11.
  37. Weisel J, Litvinov R. Red blood cells : the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J Atrial Fibrillation*. 2018;1–12.
  38. Mackman N. The red blood cell death receptor and thrombosis. *J Clin Invest*. 2018;128(9):3747–9.
  39. Batista T, Figueiredo R, Romana D. Platelets volume indexes and cardiovascular risk factors. *REV ASSOC MED BRAS*. 2018;64(6):554–9.
  40. Bongers TN, Maat MPM De, Goor MPJ Van, Bhagwanbali V, Vliet HHDM Van, Go EB. High von Willebrand Factor Levels Increase the Risk of First Ischemic Stroke Influence of ADAMTS13 , Inflammation , and Genetic Variability. *Stroke*. 2006;37:2672–7.
  41. Wysokinski WE, Cohoon KP, Melduni RM, Mazur M, Ammash N, Munger T, et al. Association between P-selectin levels and left atrial blood stasis in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Thromb Haemost*. 2018;172:4–8.
  42. Tarnowski D, Poitz DM, Plichta L, Heidrich FM, Ruf T, Mierke J, et al. Comparison of diverse platelet activation markers as indicators for left atrial thrombus in atrial fibrillation. *Platelets* [Internet]. 2017;1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2017.1293805>
  43. Sonneveld MAH, Franco OH, Ikram MA, Hofman A, Kavousi M, Maat MPM De, et al. Von Willebrand Factor, ADAMTS13, and the Risk of Mortality. The Rotterdam Study. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2016;2446–51.
  44. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, et al. Detection of von Willebrand Factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(1):212–6.
  45. Rolda V, Marí F, Garcí A. Correlation of plasma von Willebrand factor levels , an index of endothelial damage / dysfunction , with two point-based stroke risk stratification scores in atrial fibrillation. *Thromb Res*. 2005;116:321–5.
  46. Hernández J, Gallegos B, Pérez E, Pina S, Hernández P. Efecto de la hiperglucemia en la actividad plaquetaria. *Rev Educ Bioquímica*. 2017;36(2):55–64.
  47. Ansaldo AM, Montecucco F, Sahebkar A, Dallegri F, Carbone F. Epicardial adipose tissue and cardiovascular diseases. *Int J Cardiol* [Internet]. 2018;1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.09.089>

- 
48. Sengenès C, Ancel P. Role of Epicardial Adipose Tissue in Health and Disease : A Matter of Fat ? Compr Physiol. 2018;7:1051–82.

## ANEXOS

### ANEXO I

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**SECRETARIA DE SALUD**  
**HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN**

CARTA DE **CONSENTIMIENTO INFORMADO** PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE ESTUDIO: Comparación de la concentración plasmática y estructura multimérica del Factor von Willebrand en pacientes con EVC agudo secundario a FA, pacientes con antecedente de EVC secundario a FA, pacientes con FA no valvular y sujetos sanos.

**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:** Estudiar la concentración plasmática y composición molecular del Factor von Willebrand en pacientes con Fibrilación Auricular y EVC secundario a Fibrilación Auricular.

**PROCEDIMIENTO:** Ha sido elegido para participar en este estudio, si usted desea participar, contestará un cuestionario y proporcionará una muestra de sangre para determinar los niveles del factor de Von Willebrand y la composición del mismo.

**BENEFICIOS PARA PARTICIPANTES:** Los resultados aportarán información nueva e importante acerca del estado actual de la enfermedad de los pacientes con Fibrilación Auricular y EVC secundario a Fibrilación Auricular.

**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. 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). Sé que las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio. Los costos del estudio los cubrirán los fondos de la unidad de investigación y el paciente no pagará por los estudios paraclínicos propios del proyecto de investigación.

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**

\_\_\_\_\_  
**NOMBRE, FIRMA DEL PACIENTE Y FECHA**

\_\_\_\_\_  
**FIRMA DE TESTIGO I Y FECHA**

\_\_\_\_\_  
**FIRMA DE TESTIGO II Y FECHA**

## ANEXO II

### Formato de recolección de datos clínicos y bioquímicos

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHAVEZ"  
DIVISION ESTUDIOS DE POSGRADO  
LABORATORIO DE HEMOSTASIA Y BIOLOGIA VASCULAR

FECHA: \_\_\_\_\_

INICIALES DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

SEXO: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_ DIAGNOSTICO: \_\_\_\_\_

LUGAR DE PROCEDENCIA: \_\_\_\_\_

TEL: \_\_\_\_ (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

No. EXP: \_\_\_\_\_

1. Enfermedades concomitantes.	Sí	No
• ¿Padece Diabetes Mellitus?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• ¿Padece Hipertensión arterial?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• ¿Ha padecido hemorragias en los últimos 3 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Tabaquismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Alcoholismo Crónico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Cardiopatía Isquémica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Insuficiencia Cardíaca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Otro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

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

2. Medicamentos. INR \_\_\_\_\_

- ❖ Anticoagulantes: Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
- ✓ Acenocumarina
  - ✓ Warfarina
  - ✓ Ribaroxabán
  - ✓ Apixabán
  - ✓ Dabigatrán

- ❖ Antiagregantes plaquetarios: Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
- ✓ Aspirina
- ✓ Clopidogrel

**3. Antecedentes (Familiar primer grado con Cardiopatía):**

---

---

Puntuación CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc		
<b>C</b>	Insuficiencia Cardíaca o Disfunción Sistólica Ventricular Izquierda	<b>1</b>
<b>H</b>	Hipertensión Arterial	<b>1</b>
<b>A</b>	Edad ≥75 años	<b>2</b>
<b>D</b>	Diabetes Mellitus	<b>1</b>
<b>S</b>	ACV, AIT, Tromboembolia	<b>2</b>
<b>V</b>	Enfermedad Vascular (IAM previo, Enfermedad Arterial periférica, Placa aórtica).	<b>1</b>
<b>A</b>	Edad 65-74 años	<b>1</b>
<b>Sc</b>	Categoría de Sexo (Femenino)	<b>1</b>
Total (Máximo 9 puntos)		

- 0** Riesgo bajo
- 1** Riesgo moderado
- ≥2** Riesgo elevado

INICIALES DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_

**1. Medidas antropométricas.**

<b>Peso</b>		<b>Talla</b>		<b>IMC</b>	
-------------	--	--------------	--	------------	--

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Estatura}^2 \text{ (Mts)}}$$

<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Clasificación</b>
18.5-24.9	Normal
25-29.9	Sobrepeso
>30	obesidad


**2. Signos vitales.**

<b>Presión arterial sistólica</b> 90-120 mmHg	
<b>Presión arterial diastólica</b> 60-80 mmHg	
<b>Presión arterial media</b> 70-105 mmHg	
<b>Frecuencia cardiaca</b> 50-100 latidos/min	
<b>Frecuencia respiratoria</b> 12-20 respiraciones/min	

**3. Grupo sanguíneo.**

<b>HEMOTIPO</b>

**4. Marcadores bioquímicos.**

<b>Variables de estudio</b>	Concentración de FvW	
	Multímeros del FvW	
	Distribución multimérica del FvW	
	Concentración de ADAMTS-13	

<b>Perfil de lípidos</b>	Colesterol LDL HDL VLDL	
	Triglicéridos	
<b>Química sanguínea</b>	Glucosa	
	Creatinina	
	Nitrógeno Ureico	
	Urea	
	Ácido úrico	

<b>Biometría Hemática</b>	Leucocitos	
	Eritrocitos	
	Hemoglobina	
	Hematocrito	
	Volumen Corpuscular Medio	
	Hemoglobina Corpuscular Media	
	Conc. Hemoglobina Cor. Media	
	Ancho de distribución de eritros	
	Plaquetas	
	Volumen Plaquetario Medio	

<b>Frotis Sangre Periférica</b>	Neutrófilos	
	Linfocitos	
	Monocitos	
	Eosinófilos	
	Basófilos	
	Bandas	

## ANEXO III

### Soluciones para electroforesis

- **Gel de corrimiento 1.8%:**

Calentar y disolver 0.126g de agarosa Seakem® en 7 mL de buffer para gel de corrimiento (para un gel).

Buffer para gel de corrimiento:

TRIS base.....12.11 g  
SDS.....0.2 g  
Agua destilada C.B.P.....200 mL  
pH 8.8

- **Gel concentrador 1%:**

Calentar y disolver 0.02g de agarosa Seakem® en 2 mL de buffer para gel concentrador (para un gel).

Buffer para gel concentrador:

TRIS base.....1.54g  
SDS.....0.1g  
Agua destilada C.B.P.....100mL  
pH 6.8

- **Solución de dilución de la muestra (SDM):**

Preparar en este estricto orden y al momento que se va a utilizar para evitar la degradación de la urea.

Agua destilada.....9mL  
Urea 8M.....4.8g  
SDS.....0.2g  
Solución Stock para la muestra.....1mL  
pH 8

- **Solución Stock para la muestra:**

TRIS.....0.6055g  
EDTA de sodio.....0.186g  
Agua destilada C.B.P.....50mL

- **Buffer regulador de electroforesis:**

TRIS base.....12g  
Glicina.....57.6g  
SDS.....2g  
Agua destilada C.B.P.....2000mL  
pH 8.35

- **Azul de bromofenol 3%:**

Agua destilada.....5mL  
Azul de bromofenol.....0.15g

## ANEXO IV

### Soluciones para western blot

- **Buffer de transferencia:**

Preparar siempre al momento que se va a utilizar y colocar el metanol hasta el final para prevenir su pérdida por evaporación.

Glicina.....	1.46g
TRIS base.....	2.90g
SDS.....	0.1g
Metanol.....	100mL
Agua destilada C.B.P.....	500mL

- **Solución de bloqueo:**

TBS-T 0.15M.....	10mL
Albúmina.....	0.03g

- **Anticuerpo primario (1:2000):**

TBS-T 0.15M.....	10mL
Albúmina.....	0.03g
Anticuerpo primario.....	5µL

- **Anticuerpo secundario (1:4000):**

TBS-T 0.15M.....	10mL
Albúmina.....	0.03g
Anticuerpo secundario.....	3µL

- **TBS sin tween:**

TBS 10X.....	50mL
Agua destilada.....	450mL

- **TBS 10X:**

Preparar primero con 400mL de agua destilada, ajustar pH a 7.6 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [1M] y aforar.

TRIS base.....	12.11g
NaCl.....	40.03g
Agua destilada C.B.P.....	500mL
pH 7.6	

- **TBS-T 0.15M (A partir de TBS 10X):**

TBS 10X.....	50mL
Tween 20.....	0.5mL
Agua destilada.....	450mL

- **Solución de rasurado (Stripping):**

Glicina.....	2.3468g
SDS.....	1.25g
Agua destilada C.B.P.....	125mL

**Nota:** guardar las soluciones en refrigeración, duran alrededor de un mes (4-5 corrimientos).

## ANEXO V

### Reactivos

- Ácido sulfúrico, J.T.BAKER, Catalog#9681-02
- Agarosa SeaKem® HGT, Lonza, Catalog#50040 125G
- Albúmina Sérica Bovina, RESEARCH ORGANICS, Catalog#1331A
- Anticuerpo primario (anticuerpo de conejo anti-FvW humano Dako Denmark) A0082
- Anticuerpo secundario (conjugado de cabra anti IgG de conejo, IgG-HRP peroxidasa Dako Denmark) P0217
- Azul de bromofenol, Sigma-Aldrich
- Cloruro de sodio, J.T.BAKER, Catalog#3624-01
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), BIO-RAD, Catalog#161-0301
- EDTA, J.T.BAKER, Catalog#8993-01
- Etanol
- Glicina, BIO-RAD, Catalog#161-0724
- Luminol Immuno Cruz, Santa Cruz Biotechnology, SC-2048
- Metanol, J.T. Baker, Cat # 9070-03
- Trizma® base, Sigma, T6066-500G
- Tween® 20, BIO-RAD, Cat # 170-6531
- Urea, Sigma, U5378-500G

### Material y equipo

- Espectrofotómetro de placa para ELISA.
- Cámara para electroforesis vertical (Bio-rad mini-PROTEAN®)
- Fuente de poder (BIO-RAD PowerPacTMHC. 250V, 3.0A, 300W)
- Equipo de transferencia en semi-seco (Bio-rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell).
- Membranas PVDF, BIO-RAD Immun-Blot® PVDF, Catalog#162-0177
- Papel filtro, Biorad, Extra thick blot paper Cat # 1703967 (8.6 x 13.5cm)  
ó Papel filtro, Biorad, Extra thick blot paper Cat # 1703966 (7 x 8.4 cm)
- Micropipeta de 5mL, CAPP Denmark, C5000-1 JA 11726
- Jeringa Hamilton 80565 50µL