

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN**

**EFECTO DE ROSUVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN
DE MOLÉCULA DE ADHESIÓN VASCULAR 1 EN
CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS ACTIVADAS POR
SUERO DE PACIENTES CON SÍNDROME DE
ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

PRESENTA:

Laura Aline Martínez Martínez

DIRECTORES DE PROYECTO:

Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes

Dr. Luis Javier Jara Quezada

MÉXICO D. F.

OCTUBRE 2007

***Esta tesis fue realizada en el Laboratorio
Multidisciplinario de la Sección de Postgrado de la
Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico
Nacional bajo la dirección del
Dr Guillermo Manuel Ceballos Reyes y en la Unidad de
Investigación de la Unidad Médica de Alta Especialidad
La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social con la
codirección del Dr Luis Javier Jara Quezada.***

1. DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a todos aquellos pacientes, maestros, familia y amigos que han tocado mi vida para crecer con cada experiencia clínica, ejemplo, palabra de aliento, consejo y cariño sobre todo en la convivencia diaria.

Por trascender en mi ...

GRACIAS.

2. AGRADecIMIENTOS

Al Dr Guillermo Manuel Ceballos Reyes por todas las oportunidades de mi vida, es de usted el mérito de gran parte de mi crecimiento tanto humano como académico y profesional.

Gracias toda la vida es muy poco para todo lo que he recibido de Usted.

Al Dr Luis Javier Jara Quezada por darme la oportunidad de observar el rígido proceso de la investigación bajo la mirada clínica, por enseñarme el importante vínculo con la investigación básica y por dirigir mi vida en un sentido correcto.

A la Dra Mary Carmen Amigo por enseñar con el ejemplo diario el ejercicio clínico y académico, por permitirme observar que una mujer con fortaleza y trabajo es una gran médico e investigadora y sobre todo con la sensibilidad de un gran ser humano. Gracias a la vida por permitirme coincidir con usted en el Instituto Nacional de Cardiología, se le extraña día a día.

Al Dr Ricardo Yañez Avila† y Maestra Olga por mis primeros contactos con la investigación y su calidez en las aulas.

A Ale, Marisol, Oscar, Israel, Cecy, Ita, Jorge, Jesús, Karina, Alejandro y Gustavo porque su ayuda y amistad ha sido pilar en mi paso por esta experiencia humana.

A Rosy, Julio, David, Don Juan y toda la familia biológica y urbana por su apoyo incondicional.

Al pensamiento y fundamentos más puros y nobles del Instituto Politécnico Nacional, del Instituto Mexicano del Seguro Social, y del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, instituciones a las cuales agradezco mi formación, en donde he encontrado grandes seres humanos que han tocado mi vida.

¡¡¡¡ A todos ustedes muchas gracias !!!!

3. ÍNDICE

Acta de revisión de tesis.....	1
Carta de cesión de derechos.....	2
1. Dedicatoria.....	4
2. Agradecimientos.....	5
3. Índice.....	6
3.1. Índice de figuras.....	8
3.2. Índice de tablas.....	9
3.3. Índice de gráficas.....	10
4. Abstract.....	11
5. Resumen.....	12
6. Introducción.....	14
7. Antecedentes.....	15
7.1. Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.....	15
7.2. Anticuerpos antifosfolípidos.....	19
7.3. Molécula de adhesión vascular – 1 (VCAM-1).....	21
7.4. Activación endotelial y anticuerpos antifosfolípidos.....	23
7.5. Tratamiento del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.....	24
7.6. Estatinas.....	25
7.7. Rosuvastatina.....	27
8. Justificación.....	31
9. Planteamiento del problema.....	32
10. Pregunta de investigación.....	33
11. Objetivo.....	35
12. Hipótesis.....	35
13. Metodología.....	36
13.1. Población.....	36
13.2. Diseño del estudio.....	36
13.2.1. Grupo SAF.....	36
13.2.2. Grupo control.....	36
13.3. Criterios de selección.....	36

13.3.1. Criterios de inclusión.....	36
13.3.2. Criterios de no inclusión.....	36
13.3.3. Criterios de exclusión.....	37
13.4. Descripción de variables.....	37
13.4.1. Variable independiente.....	37
13.4.2. Variable dependiente.....	38
13.5. Descripción operativa del estudio.....	39
13.5.1. Obtención del material biológico del grupo SAF y del grupo control.....	39
13.5.2. Obtención del cultivo primario.....	39
13.5.3. Mantenimiento de la línea celular.....	40
13.5.4. Estimulación celular.....	40
13.5.5. Inmunocitoquímica.....	41
13.5.6. Western blot.....	41
13.5.7. Datos clínicos y de laboratorio.....	43
13.6. Método de observación.....	44
13.7. Tamaño de la muestra.....	44
13.8. Análisis estadístico.....	45
13.9. Aspectos éticos.....	45
14. Resultados.....	47
14.1. Efecto del suero de los pacientes con SAF primario sobre la expresión de VCAM-1.....	47
14.2. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 evaluada por inmunocitoquímica.....	50
14.3. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 evaluada por western blot.....	53
14.4. Datos clínicos de los pacientes con SAF y controles.....	56
15. Discusión.....	60
16. Conclusiones.....	69
17. Glosario.....	70
18. Bibliografía.....	72

3.1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la rosuvastatina.....	28
Figura 2. Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero control con inmunocitoquímica para VCAM-1.....	48
Figura 3. Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero SAF con inmunocitoquímica para VCAM-1.....	48
Figura 4. Imágenes representativas del efecto de suero control, suero SAF, y suero SAF en presencia de rosuvastatina a concentraciones 2.79µM, 27.9µM y 279µM.....	51
Figura 5. Imagen representativa de tiras de gel de la técnica de western blot....	54

3.2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos de Sapporo.....	15
Tabla 2. Criterios del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos catastrófico.....	19
Tabla 3. Efecto del suero control y del suero de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos sobre la expresión de VCAM-1.....	47
Tabla 4. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 estimulada por el suero SAF evaluada por inmunocitoquímica.....	50
Tabla 5. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 estimulada por el suero de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos evaluada por western blot.....	53
Tabla 6. Datos demográficos y somatométricos de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y controles.....	56
Tabla 7. Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.....	58

3.3. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto del suero control y SAF en la expresión de VCAM-1 medida por inmunocitoquímica.....	49
Gráfica 2. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 estimulada por suero SAF evaluada mediante inmunocitoquímica.....	52
Gráfica 3. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 estimulada por suero SAF evaluada mediante western blot.....	55

4. ABSTRACT

EFFECT OF ROSUVASTATIN ON VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE 1 EXPRESSION BY HUMAN ENDOTHELIAL CELL ACTIVATED BY ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES SYNDROME PATIENT'S SERUM

BACKGROUND: Antiphospholipid antibodies activate endothelium allowing cell adhesion molecule expression inducing a pro-inflammatory coagulant phenotype and also associated to atherosclerosis. Nowadays, the treatment of antiphospholipid antibodies syndrome consist of oral anticoagulant, however, the beneficial of the pleiotrophic effects of statins has not been study yet.

OBJETIVE: We propose rosuvastatin decrease vascular cell adhesión molecule 1 (VCAM-1) expression from endothelium wich it is stimulated by antiphospholipid antibodies syndrome's (APS) serum.

METHODOLOGY: Human umbilical vascular endothelial cell (HUVEC) monolayer culture from healthy women was obtained. Endothelial cells were exposed to primary APS and healthy controls serum. In the same way HUVEC was exposed to primary APS'serum in presence of to 2.79µmolar, 27.9 µmolar and 279 µmolar concentrations of rosuvastatin. VCAM-1 expression was measured semi-quantitatively by immunocitochemistry and expressed as pixel/area.

RESULTS: VCAM-1 basal expression (control subjets) was 44.58 ± 17.83 pixel/area (mean \pm standar desviation). VCAM-1 expression from APS was 136.17 ± 14.09 pixel/area, greater than APS plus rosuvastatin 2.79µmolar 83.47 ± 13.17 pixel/area, rosuvastatin 27.9µmolar 81.41 ± 12.66 and rosuvastatin 279µmolar 71.96 ± 5.7 ($p=0.003$). The result of Western blot confirm this difference 0.40 vs 0.37 arbitrary unit of APS and APS with rosuvastatin 279µmolar respectively.

CONCLUSION: VCAM-1 expression in HUVEC stimulated by primary APS decrease in presence of rosuvastatine.

5. RESUMEN

INTRODUCCIÓN. Los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF) cursan con trombosis arterial y venosa y complicaciones materno fetales. Estos pacientes cursan con aterosclerosis acelerada. El tratamiento consiste principalmente en disminuir los factores de riesgo de trombosis y uso de anticoagulación oral. La presencia de anticuerpos antifosfolípidos activa a las células endoteliales permitiendo la expresión de moléculas de adhesión y favoreciendo un estado inflamatorio relacionado con aterosclerosis. Sin embargo, es motivo de controversia si las estatinas son capaces de disminuir la actividad endotelial causada por el suero de estos pacientes y así explicar en parte su efecto benéfico sobre la aterosclerosis.

OBJETIVO. Determinar el efecto de rosuvastatina sobre la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 en células endoteliales en cultivo monocapa cuando estas se encuentran expuestas al suero de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se realizó cultivo monocapa de células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) de mujeres sanas. Las células endoteliales fueron expuestas al suero de sujetos sanos y de pacientes con SAF primario y al suero de SAF en presencia de diferentes concentraciones de rosuvastatina: 2.79 μ molar, 27.9 μ molar y 279 μ molar. La expresión de la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) fue evaluada semicuantitativamente con inmunocitoquímica (expresada en pixeles/área de imágenes digitalizadas) y cuantitativamente por western blot.

RESULTADOS. La expresión basal (grupo control) de VCAM-1 fue de 44.58 ± 17.83 (pixeles/área) y la expresión de VCAM-1 en el grupo SAF primario fue de 136.17 ± 14.09 ($p=0.001$). La adición de rosuvastatina disminuyó la expresión de VCAM-1 estimulada por el grupo de sueros de pacientes con SAF: rosuvastatina 2.79 μ molar: 83.47 ± 13.17 (NS), rosuvastatina 27.9 μ molar 81.41 ± 12.66 (NS) y rosuvastatina 279 μ molar 71.96 ± 5.7 ($p=0.005$). Los resultados con Western blot confirmaron estas diferencias (0.40 vs 0.37 unidades arbitrarias) de SAF y en presencia de rosuvastatina 279 μ molar en comparación con los valores basales.

CONCLUSION. La expresión de VCAM-1 en HUVEC estimulada por suero de pacientes con SAF disminuye significativamente en presencia de rosuvastatina. La rosuvastatina puede tener un efecto antiaterogénico inhibiendo la activación endotelial causada por el suero de pacientes con SAF primario.

6. INTRODUCCIÓN

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF) se caracteriza por la presencia de eventos de trombosis arterial y/o venosa y morbimortalidad obstétrica en asociación con anticuerpos antifosfolípidos circulantes. Los mecanismos patogénicos del SAF se basan en la interacción de estos autoanticuerpos con las células endoteliales, lo que condiciona fenómenos de activación endotelial y un estado pro-trombótico.

Actualmente hay evidencias de procesos de aterosclerosis acelerada en los pacientes con SAF y se ha propuesto que los anticuerpos antifosfolípidos pueden participar en el desarrollo de esta complicación. Esta hipótesis proviene de estudios *in vitro*, modelos experimentales de SAF y estudios con pacientes.

El tratamiento de la aterosclerosis se basa en un riguroso control de los factores de riesgo tradicionales y en el uso de medicamentos como las estatinas las cuales tienen efectos pleiotropicos independientemente de causar una disminución de la concentración sérica de colesterol. Estos efectos mejoran la función endotelial, estabilizan la placa aterosclerótica y evitan su progresión.

El tratamiento de los pacientes con SAF consiste en controlar los factores de riesgo para trombosis, así como el uso de aspirina y anticoagulantes orales. Sin embargo los beneficios del uso de estatinas en la práctica clínica para el control de la aterosclerosis en estos pacientes son poco conocidos.

La interacción entre anticuerpos antifosfolípido y células endoteliales conduce a una sobre-expresión de moléculas de adhesión celular. Estudios *in vitro*, utilizando un modelo de células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) han sugerido que el incremento de estas moléculas puede ser inhibido por algunas estatinas como atorvastatina y fluvastatina, sin embargo existe controversia acerca de este efecto benéfico y el papel de la rosuvastatina no ha sido estudiado.

En este trabajo nos proponemos explorar el efecto de rosuvastatina sobre la expresión de las moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1), que se encuentra involucrada en los procesos de activación endotelial y aterosclerosis, en un modelo *in vitro* con base en la utilización de suero total de pacientes con SAF en una aproximación holística de la enfermedad.

7. ANTECEDENTES

7.1. SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (aFL) es una enfermedad caracterizada por un estado de hipercoagulabilidad y los desenlaces clínicos más reconocidos son los eventos tromboticos vasculares y morbilidad obstétrica. Los aFL más importantes son: el anticoagulante lúpico (AL), anticuerpos anticardiolipina (aCL) y anti- β 2 glicoproteína-I (β 2GPI) (1).

La presencia de aFL eleva el riesgo de presentar recurrencia de eventos tromboticos de 3 a 10 veces (2) y se ha asociado a 37% de los eventos tromboembólicos por enfermedad valvular coronaria, en comparación a 11% en los pacientes con enfermedad valvular cardiaca que no tienen aFL (3).

A pesar del reconocimiento de la importancia clínica de los anticuerpos antifosfolípidos desde trabajos reportados en 1983, fue hasta 1988 en Sapporo, Japón, en donde se propusieron los criterios clasificatorios del SAF (tabla1), definidos por criterios clínicos y de laboratorio (4).

Tabla 1. Criterios de Sapporo.

Criterios clínicos	Trombosis vascular	Uno o más episodios de trombosis venosa o arterial, o trombosis de vasos pequeños confirmada por estudios de imagen ó histopatología en cualquier órgano, con excepción de trombosis venosa superficial.
	Criterios obstétricos	1) Una ó más muertes inexplicables más allá de las 10 primeras semanas de gestación (SDG) con feto con morfología normal. 2) Uno ó más partos prematuros antes de la 34 ^a SDG con producto morfológicamente normal debido a preeclampsia, eclampsia ó insuficiencia placentaria severa.

		<p>3) Tres ó más abortos espontáneos inexplicables consecutivos antes de las 10 SDG habiendo excluido como causas anormalidades maternas anatómicas ó metabólicas, así como paternas.</p>
<p>Criterios de laboratorio</p>	<p>1) Demostrar la presencia de anticuerpos anticardiolipinas IgG ó IgM presentes por lo menos en 2 ocasiones con 6 semanas de diferencia, medidos por ensayo enzimático estandarizado inmunoabsorbente (ELISA) para anticuerpos dependientes de beta 2 glicoproteína I.</p>	
	<p>2) Evidenciar la presencia de anticoagulante lúpico medido en 2 ocasiones por lo menos con 6 meses de diferencia, demostrando coagulación prolongada dependiente de fosfolípidos. Ésta última se realiza demostrando la prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activada, tiempo de coagulación con kaolina, tiempo con dilución de veneno de víbora de Russell, tiempo de protrombina ó tiempo de texarin. También se requieren las siguientes condiciones: la falta de corrección del tiempo de coagulación prolongado cuando se mezcla con plasma normal repletado de plaquetas; acortamiento ó corrección del tiempo de coagulación prolongado con la adición de exceso de fosfolípido; así como la exclusión de otras causas de coagulopatias, como heparina ó inhibidor del factor VII. Para considerar que el SAF se encuentra presente en un individuo, por lo menos debe cumplir un criterio clínico y un criterio de laboratorio (4).</p>	

Existen otras características clínicas y de laboratorio que se pueden presentar en estos pacientes además de los criterios clasificatorios del SAF. Tales características clínicas son livedo reticularis, trombocitopenia, usualmente de 50000 a 100000 plaquetas/mm³, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad valvular cardiaca, mielopatía y síndromes similares a esclerosis múltiple, síndromes neurológicos no focales, corea, síndrome de oclusión vascular catastrófico o también llamado SAF catastrófico, hipertensión arterial pulmonar y falla renal por microangiopatía trombótica.

Las características de laboratorio y gabinete que también se pueden encontrar son las siguientes: anticuerpos anticardiolipinas del tipo IgA, anticuerpos anti β 2GPI, anticuerpos anti fosfatidilserina, anti fosfatidilinositol, anti fosfatidilglicerol, anti fosfatidiletanolamina, proteinuria, pruebas de hemoaglutinación para sífilis falsas positivas y lesiones hiperintensas en la fase T2 en resonancia magnética de cráneo.

Dadas las múltiples manifestaciones clínicas del SAF recientemente se han revisado los criterios de Sapporo (5).

En esta revisión, dentro de los criterios clínicos de trombosis vascular se considera la presencia o ausencia de factores adicionales para trombosis estableciendo los subgrupos a y b respectivamente en este criterio clínico. Y también se incluye en los criterios de laboratorio la determinación de anti β 2GPI, tanto isotipo IgG como IgM, y la determinación de laboratorio de los aCL, AL ó anti β 2GPI se debe realizar a las 12 semanas en vez de 6 semanas de diferencia.

En estos criterios modificados se establecen 4 tipos de SAF con base en los criterios de laboratorio cumplidos:

Tipo I: más de un criterio de laboratorio presente en cualquier combinación.

Tipo II a: presencia aislada de AL

Tipo II b: presencia aislada de aCL

Tipo II c: presencia aislada de anti β 2GPI

En los criterios de Sapporo revisados además se consideran las manifestaciones del SAF más frecuentes, aún cuando no pueden ser consideradas estrictamente para su diagnóstico, tales como, enfermedad valvular cardiaca, livedo reticularis,

trombocitopenia, neuropatía, manifestaciones neurológicas, aCL isotipo IgA, anti β 2GPI isotipo IgA, anticuerpos anti fosfatidilserina, anticuerpos anti fosfatidiletanolamina, anticuerpos antiprotrombina aislada, y anticuerpos contra el complejo fosfatidilserina-protrombina. Estas manifestaciones en particular se revisaron estableciendo criterios específicos para cada una.

El SAF se puede presentar en forma conjunta con enfermedades autoinmunes sistémicas tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, entre otras, en tal circunstancia se denomina secundario. Cuando no se encuentra evidencia de otra enfermedad autoinmune sistémica asociada se denomina como SAF primario (6).

Los pacientes con SAF que también son portadores de lupus eritematoso sistémico y los pacientes con SAF primario, tienen perfiles clínicos similares aunque hay algunas diferencias. Las valvulopatías, anemia hemolítica autoinmune, complemento C4 bajo y neutropenia son más comunes en los pacientes con SAF secundario a lupus eritematoso sistémico que en los pacientes con SAF primario (7). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el lupus existe un contexto más amplio de autoinmunidad y por ello no sólo participan los anticuerpos antifosfolípidos en la patogenia del estado procoagulante ya que hay otros anticuerpos y sistemas alterados, dependiendo del grado de afectación del lupus. Por estas diferencias fisiopatológicas se debe establecer, en primer lugar, la interacción del endotelio y anticuerpos antifosfolípidos considerando SAF primario. En segundo lugar, bajo la consideración de estas diferencias se debe estudiar al SAF secundario. No se debe suponer que ambos procesos son iguales (8). También puede suceder en forma inusual la progresión de SAF primario a SAF secundario (9).

Una de las condiciones más severas del SAF es el SAF catastrófico. Éste se define como una afectación sistémica con trombosis en varios órganos desarrollándose simultáneamente en un periodo corto de tiempo que amenaza la vida (tabla2). La mortalidad de esta variante fluctúa alrededor del 45-50%. Independientemente del desenlace mortal del SAF catastrófico, los sobrevivientes

tienen complicaciones dependiendo de los territorios afectados por los eventos trombóticos y esto repercute en su calidad de vida (10,11,12).

Tabla 2. Criterios del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos catastrófico

<p>Criterios de SAF catastrófico:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Evidencia de involucro de 3 o más órganos, sistemas o tejidos.2. Desarrollo de manifestaciones simultáneas o en menos de una semana.3. Oclusión de pequeños vasos en al menos un órgano o tejido confirmada por histopatología.4. Presencia de anticuerpos antifosfolípido (AL o aCL) confirmados por laboratorio.
<p>SAF catastrófico definitivo</p> <p>Cumple todos los 4 criterios</p>
<p>SAF catastrófico probable</p> <p>Cumple todos los 4 criterios, excepto que sólo involucra 2 órganos, sistemas o tejidos</p> <p>Cumple todos los 4 criterios excepto por la ausencia de confirmación de laboratorio a las 6 semanas por la muerte temprana de aquel paciente que nunca se realizó prueba de anticuerpos antifosfolípidos antes del evento de SAF catastrófico.</p> <p>Cumple los criterios 1, 2 y 4.</p> <p>Cumple los criterios 1, 3 y 4, y el desarrollo e un tercer evento en un periodo mayor de 1 semana pero menor de 1 mes a pesar de anticoagulación.</p>

7.2. ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

Los anticuerpos antifosfolípidos constituyen un grupo heterogéneo de anticuerpos circulantes principalmente dirigidos contra componentes de tipo fosfolípidos cargados negativamente. Se dividen en 2 grupos principalmente: los aCL y el AL. Recientemente se ha agregado como marcador del SAF la determinación de

anticuerpos anti β 2GPI, así como otros anticuerpos dirigidos contra protrombina, proteína C, proteína S, activador tisular de plasminógeno, anexina V, trombomodulina, factor XII, cininógenos de alto y bajo peso molecular, factor VII/VIIIa y componentes del complemento H y C4b.

Clínicamente los pacientes que presentan AL tienen resultados no valorables en las pruebas de coagulación (6), reaccionando en los eventos de trombofilia observados en los ensayos clínicos (13).

Los posibles mecanismos que pueden explicar los efectos de los anticuerpos antifosfolípidos implican que estos anticuerpos pueden unirse en forma cruzada a componentes de las membranas celulares y producir activación celular. También pueden alterar las reacciones hemostáticas dependientes de fosfolípidos mediante la unión a la superficie celular de células inflamatorias y células endoteliales, modificando la expresión de moléculas de adhesión (2,6,13,14) y secreción de citocinas proinflamatorias.

Se propone que como consecuencia de la elevación persistente de anticuerpos antifosfolípido presentes en los pacientes se puede producir activación ó daño endotelial. El proceso inicia con la activación ó apoptosis de plaquetas, células endoteliales ó trofoblastos, cuando se expone la molécula de fosfatidilserina cargada negativamente. Así, la β 2GP1 se une a la fosfatidilserina y se inicia la cascada de activación celular que permite la expresión de moléculas de adhesión. La expresión de este tipo de moléculas favorece la formación de agregados plaquetarios y desencadena la trombosis. A nivel placentario, los anticuerpos antifosfolípidos están dirigidos contra fosfatidilserina y un anticoagulante placentario natural, la anexina V, interrumpiendo un mecanismo natural encaminado a proteger al feto de los efectos protrombóticos de la madre en gestación. En modelos animales se ha comprobado que los anticuerpos antifosfolípidos inducen la expresión de moléculas de adhesión y la consecuente adherencia de leucocitos al endotelio (6,13,14).

Otro mecanismo mediante el cual se ha encontrado un papel que sugiere la asociación entre un fenómeno trombótico y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos es la reciente evidencia de una asociación entre un proceso de

ateroesclerosis acelerada y anticuerpos antifosfolípidos, considerando la aterosclerosis como un proceso inflamatorio ó autoinmune.

Existe evidencia de que los anticuerpos antifosfolípidos tienen actividad cruzada con lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas y es sabido que éstas favorecen el proceso de aterosclerosis. Por otro lado, en modelos con roedores se presenta aterosclerosis acelerada cuando hay exposición a la β 2GP1. La paroxonasa es una enzima con actividad antioxidante, se encuentran formando parte de la HDL y actualmente se ha relacionado disminución de su actividad en presencia de anticuerpos antifosfolípidos tanto en pacientes con SAF secundario a lupus como SAF primario. En estos pacientes hay IgG anti HDL e IgG anti β 2GPI (13).

En el SAF se propone que también hay un desequilibrio del estrés oxidante, de tal manera que la lipoperoxidación de lípidos, que es un marcador de este estrés, se encuentra aumentada (6,14).

Respecto a la medición de anticuerpos antifosfolípidos, se pueden expresar en forma semicuantitativa considerando para IgG/IgM como valores positivos bajos (5-15/<6.0), positivos medios (15-80/6-50), ó altos positivos (>80/>50unidades), respectivamente (4).

El concepto de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos seronegativo no existe, pero por el contrario si se pueden encontrar valores positivos bajos de anticuerpos antifosfolípidos en población sana hasta en un 2%. Estas personas son asintomáticas, es decir, sin evidencia clínica de SAF y hasta el momento la conducta depende de los factores de riesgo asociados a cada paciente. Por lo general ameritan seguimiento estrecho posterior y profilaxis con aspirina a dosis bajas (2, 6).

7.3. MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR VASCULAR-1 (VCAM-1)

Desde principios del siglo pasado se observó que al disociar mecánicamente las células de dos especies diferentes de esponjas marinas, y colocar en medio líquido una mezcla de ellas, éstas se reunían nuevamente formando las mismas esponjas originales. Esto demostró que las células de un organismo se reconocen

entre sí y tienden a adherirse. Las moléculas responsables de este fenómeno son denominadas "Moléculas de Adhesión Celular" (CAM, término anglosajón). Estas moléculas son un conjunto muy complejo cuyas funciones van más allá del simple reconocimiento y adherencia celular, ya que se encuentran involucradas en procesos fisiológicos y fisiopatológicos (15,16).

Las moléculas de adhesión celular son glicoproteínas ubicadas en la superficie celular, las cuales realizan interacciones específicas célula-célula. Estas glicoproteínas tienen el carboxi-terminal fijo en el citoplasma y en el cito-esqueleto. Inmediatamente después del carboxi-terminal se encuentra la región transmembranal, que atraviesa la membrana celular. El resto de la glicoproteína se ubica extracelularmente y el amino-terminal da la especificidad a la molécula para unirse a otras moléculas de adhesión. De acuerdo al número de cadenas, las moléculas de adhesión pueden ser monoméricas, formadas por una sola cadena glicoproteína, diméricas constituidas por dos cadenas idénticas y heterodiméricas, en las cuales ambas cadenas son diferentes.

Existen cinco familias estructurales de moléculas de adhesión: cadherinas, del supergen inmunoglobulinas, integrinas, selectinas, y proteoglicanos.

La molécula de adhesión vascular celular-1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) pertenecen la familia del supergen de inmunoglobulinas. El tiempo que tarda la expresión de estas moléculas de adhesión varía de 12 a 48 horas, ya que se requiere el proceso de síntesis de proteínas. Se considera que este hecho es parte del proceso de activación de la célula endotelial, el cual tiene un papel importante en la fisiopatología de SAF por estar directamente involucradas en los procesos inflamatorios, trombóticos y aterosclerosis de esta enfermedad (17,18). Además, otro hecho que relaciona estos procesos, es que los niveles circulantes de VCAM-1 correlacionan con la expresión de RNAm de VCAM-1 en muestras de aorta humana aterosclerótica (19). Específicamente, se ha observado que la VCAM-1 soluble correlaciona con la extensión de aterosclerosis en seres humanos a diferencia de ICAM-1, E-selectina y P-selectina (20). Particularmente en pacientes con SAF se han encontrado niveles elevados de VCAM-1 soluble los cuales correlacionan con la gravedad de las trombosis en

estos pacientes (21) y también se ha propuesto que esta molécula está involucrada en la activación endotelial mediada por anticuerpos antifosfolípidos (22).

7.4. ACTIVACIÓN ENDOTELIAL Y ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS.

Las células endoteliales, al recubrir la vasta superficie del interior del sistema cardiovascular en el organismo, se encuentran como interfase inmediata para el desarrollo de procesos fisiológicos y patológicos. El endotelio realiza múltiples funciones: está involucrado en la regulación de la coagulación, adhesión leucocitaria, en la inflamación, control del tono vascular, de crecimiento de músculo liso vascular y actúa también como una barrera transvascular al flujo de líquidos y solutos (23). Así, lejos de ser un participante pasivo de estos efectos, es un tejido dinámico, secretando y modulando sustancias vasoactivas, influenciando el comportamiento de otros tipos celulares y regulando la producción y composición de la matriz extracelular (24). De esta manera, las funciones antitrombóticas en la célula endotelial incluyen; la producción de óxido nítrico, prostaciclina, factor activador de plasminógeno tisular y proteoglicanos similares a heparina, trombosmodulina e inhibidor del factor de activación tisular. En el caso de los pacientes con SAF, el endotelio tiene un papel importante en la patogenia de la trombofilia, no sólo por alteración de los mecanismos de hemostasia, si no por su interacción en procesos que favorecen la aterosclerosis (13,14,25).

Recientemente se ha encontrado evidencia de arterosclerosis temprana en los pacientes con SAF primario, manifestada por engrosamiento de la capa media e íntima de las arterias carotídeas (26). Se ha encontrado también que algunos anticuerpos antifosfolípidos son capaces de reaccionar en forma cruzada con LDL oxidada la cual es importante en el desarrollo de la aterosclerosis (27,28). Por otro lado, se ha encontrado que la β 2GPI puede permitir ó facilitar la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de la célula endotelial como VCAM-1, ICAM-1 y selectina E, todas proteínas de membrana cuya función es facilitar la migración celular de células inflamatorias hacia la capa íntima y media de la estructura vascular en el proceso de la aterosclerosis (13,14,25,28).

Existen ya modelos animales en los cuales se han desarrollado proteínas capaces de producir SAF en roedores a partir de la inoculación de dichas proteínas (29). Además en modelos *in vitro* se han documentado efectos patogénicos de anticuerpos antifosfolípidos en cultivo de células endoteliales mediante la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y selectina E detectadas por ELISA y reportando de 7 a 24% mayor adhesión leucocitaria en dichos cultivos (30).

7.5. TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

El tratamiento del SAF en general está encaminado a evitar las complicaciones trombóticas y eliminar los factores de riesgo trombótico que los pacientes ya tienen. Se recomienda la práctica regular de ejercicio, reducción de peso, reducción de concentraciones de colesterol cuando estos están por arriba de valores normales y evitar el tabaquismo para disminuir otros factores de riesgo para trombofilia aunado a tratamiento anticoagulante (31,32,33). Así, el tratamiento actual del SAF está dirigido a reducir el riesgo de eventos tromboembólicos. La mayoría de estudios clínicos se basan en el uso de aspirina como profiláctico para trombosis, así como heparina y aspirina en combinación en pacientes embarazadas y anticoagulantes orales. Sin embargo, el uso de anticoagulación oral con warfarina y dosis bajas de aspirina no mostró beneficio sobre la incidencia de enfermedad isquémica cardíaca en pacientes con SAF y por lo tanto aun se encuentra controvertido el valor óptimo de índice de anticoagulación (INR, international index ratio) para considerar una anticoagulación eficaz con un grado de seguridad adecuado, ya que la hemorragia es la complicación más común asociada a anticoagulación oral. En un estudio en pacientes con SAF se mostró que el nivel alto de anticoagulación oral definido como INR de 3.0 a 4.0, no era superior en la prevención de eventos trombóticos comparados con pacientes con anticoagulación de intensidad moderada (INR 0.2-3.0) y sin cambios significativos en los eventos adversos hemorrágicos (34).

El uso de corticoesteroides e inmunomoduladores, aun se encuentra con baja evidencia clínica para apoyar su uso en los pacientes con SAF (31), especialmente en los pacientes que tienen SAF secundario, ya que generalmente

se enfocan a aliviar los síntomas del proceso reumatológico subyacente, pero no se han mostrado efectos bien comprobados respecto a su eficacia en el proceso trombótico.

En el SAF también se ha encontrado disminución en los mecanismos de regulación del estrés oxidante, por lo que se sugiere por algunos autores el uso de vitaminas, aprovechando sus propiedades antioxidantes como tratamiento adjunto a estos pacientes (31).

Definitivamente el tratamiento con anticoagulantes orales es necesario en estos pacientes. Sin embargo, no es totalmente efectivo y sus riesgos son altos, por lo que se deberán explorar nuevos tratamientos adyuvantes por el momento como el uso de las estatinas (32,33).

7.6. ESTATINAS

Las estatinas son un grupo de medicamentos derivados fúngicos de potente actividad como inhibidores competitivos de la enzima hidroximetil glutaril coenzima A reductasa, la cual controla la biosíntesis de colesterol (35) y por consiguiente se produce reducción de la LDL plasmática. Dichos medicamentos también incrementan el número de receptores para LDL y para VLDL que favorecen su propia depuración y consiguiente disminución sérica. Estas propiedades se han utilizado para el control de los niveles séricos de colesterol. Sin embargo, en los pacientes con lupus eritematoso sistémico y SAF en donde los factores de riesgo tradicionales de Framingham no predicen con precisión adecuada el riesgo cardiovascular, la aparentemente disminución de colesterol sérico no parece tener gran influencia en los eventos embólicos que se presentan en estos pacientes (14,25).

A los efectos de las estatinas que no se encuentran relacionados directamente con la disminución de colesterol se llaman efectos pleiotróficos. Dentro de tales efectos destacan propiedades que favorecen la reducción de la disfunción endotelial, inhibición de respuestas inflamatorias, estabilización de la placa aterosclerótica, y modulación de la actividad procoagulante y la función plaquetaria (35), por lo que

en algunas enfermedades autoinmunes se han reconocido efectos pleiotróficos de las estatinas potencialmente benéficos para su tratamiento.

La simvastatina, por ejemplo, permite una reducción en la tasa de activación de la protrombina y la generación del factor VII y V, además que se ha documentado también reducción en la producción del factor tisular de monocitos. En este modelo *in vitro* se ha demostrado que la simvastatina y la cerivastatina preservan la actividad de la enzima CD39/ATPDasa. Se ha demostrado que la regulación endotelial de esta enzima disminuye con la presencia de procesos inflamatorios, así, si se favorece la preservación de esta proteína, se permite la preservación del metabolismo del ADP, el cual puede contribuir directamente a las acciones antiinflamatorias y antitrombóticas de éstas estatinas (36).

Por otro lado, la atorvastatina se ha probado en modelos animales de enfermedades autoinmunes con buenos resultados, como el modelo de encefalitis de esclerosis múltiple, en donde preservó la movilidad y mejoró la parálisis crónica de roedores (37). En modelos *in vitro* de HUVEC estimuladas por factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) la atorvastatina 1 micromolar (μM) ha mostrado disminución en 42% de la adhesión monocitos en condiciones de flujo laminar, sin embargo en el mismo estudio mostró aumento en la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y selectina E. Éste efecto se atribuyó a la redistribución de las moléculas de adhesión en la membrana endotelial como principal mecanismo de acción para la disminución de la adhesión de leucocitos a pesar del aumento de las moléculas de adhesión (38).

Sin embargo, no todas las estatinas son iguales, en primer lugar tienen diferentes efectos de acuerdo a la célula que estimulan y en segundo lugar su efecto también varía en relación al estímulo que ésta célula recibe. Por ejemplo, la pravastatina y la fluvastatina han demostrado disminuir la molécula ICAM-1 en células mononucleares periféricas humanas cuando se estimulan con IL-18 (39). La fluvastatina disminuye la expresión de ICAM-1 y E-selectina de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) cuando se estimulan con anticuerpos anti $\beta 2GP1$ IgG (40) y se confirmaron efectos similares *in vivo* (41), pero cuando HUVEC se estimula con anticuerpos anticardiolipinas IgG la

fluvastatina, por el contrario, aumenta la expresión de VCAM-1 y E-selectina entre otras moléculas de adhesión (42).

7.7. ROSUVASTATINA

La rosuvastatina es una de las estatinas sintéticas más recientemente introducidas en el mercado. Es un inhibidor de la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa indicada en pacientes con hipercolesterolemia primaria, dislipidemia mixta y e hipertrigliceridemia aislada, cuando ejercicio y dieta no son suficientes para corregir éstas dislipidemias.

La rosuvastatina es una sal cálcica de bis [(E)-7-[ácido 4-(4-fluorofenil)-6-isopropil-2-[metil (metilsulfonil) amino] pirimidina-5-yl] (3R,5S) -3,5-dihidroxihepta-6-enoico]. Es un compuesto hidrofílico, polvo de apariencia amorfa, de color blanco soluble en agua, metanol y etanol. Su fórmula abreviada es $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2 Ca$ y su peso molecular es 1001.14 gramos/mol (figura1).

La rosuvastatina disminuye los niveles elevados de LDL, colesterol total y triglicéridos, e incrementa los niveles HDL con mayor efectividad en comparación con otras estatinas. La rosuvastatina también disminuye las fracciones de lipoproteínas ApoB, no HDL, VLDL, VLDL-triglicéridos, los cocientes LDL/HDL, colesterol total/HDL, no HDL/HDL, ApoB/ApoA-I e incrementa ApoA-I.

Las dosis varía entre 10 a 40mg cada 24 horas, sin embargo el tratamiento se debe individualizar. Éstos rangos se pueden aplicar en pacientes con insuficiencia renal leve a moderada (depuración de creatinina >30ml/min) y en caso de insuficiencia renal severa con depuraciones de creatinina menores a 10ml/min no se recomienda exceder de 10mg cada 24 hrs. De igual manera, los pacientes con insuficiencia hepática moderada y leve pueden ser tratados con dosis de 10 a 40mg y en caso de insuficiencia hepática severa se recomiendan dosis de 5mg al día, sin embargo éstos pacientes son susceptibles a efectos acumulativos de rosuvastatina, por lo que esto se debe considerar en forma individualizada, con especial precaución en pacientes con antecedente de etilismo (43).

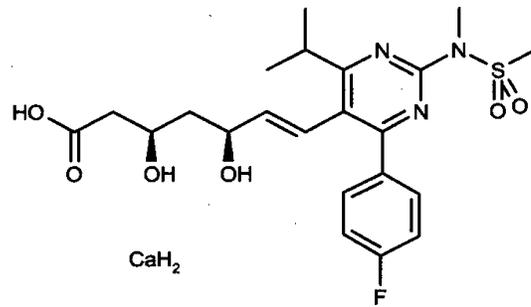


Figura 1. Estructura química de la rosuvastatina.

Los efectos sistémicos de rosuvastatina se incrementan con el uso concomitante de gemfibrozil, ciclosporina, ácido nicotínico, antimicóticos y antibióticos macrolidos.

La rosuvastatina se encuentra contraindicada en pacientes con hipersensibilidad a cualquiera de sus componentes, durante el embarazo y lactancia, así como en mujeres en edad fértil sin adecuadas medidas de anticoncepción.

La rosuvastatina así como otros inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa, pueden desencadenar mialgia y miopatias que han sido reportados en pacientes que han consumido dosis de 10 a 40mg al día. Éstos pacientes presentan elevación de enzimas musculares, que al detectarlas se debe suspender inmediatamente el medicamento. La tasa de incidencia de rabiomiolisis como principal efecto adverso es de 1/10 000. Los casos en que se han reportado de rabiomiolisis se han presentado con dosis de 80mg cada 24 horas.

Otros efectos adversos relacionados con la rosuvastatina son cefalea, mialgias, astenia, constipación, mareo, nausea, dolor abdominal, prurito, exantema y urticaria (44).

La rosuvastatina se administra vía oral presentando picos máximos a las 5 horas después de su administración. La absorción aumenta en forma lineal de acuerdo a la dosis administrada. La vida media de ésta estatina es de 19 horas. La biodisponibilidad oral de rosuvastatina es del 20%, tiene un amplia distribución

está sometido a un importante primer paso hepático y se elimina del organismo tanto por vía hepática como por excreción renal, principalmente por secreción tubular en 90% sin cambios (45,46).

La rosuvastatina también ha mostrado tener efectos pleiotropicos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

La rosuvastatina tiene un efecto protector en un modelo *in vivo* de microvasculatura mesentérica de rata profundida con trombina 0.5u/ml, en el cual se atenuó el rodamiento, adherencia y migración leucocitaria (47). Además se reporta por los mismos autores, que la rosuvastatina disminuye la expresión de E-selectina, y aumenta la liberación de óxido nítrico. Este último efecto se ha corroborado al encontrar aumento en la expresión de eNOS en un modeló de enfermedad cerebrovascular en ratas hipertensas (48), en donde también se demostró disminución en la expresión de de P-selectina por la rosuvastatina. Además, revierte el daño por isquemia cerebral focal inducido por activador de plasminogeno tisular (49). Sus efectos en modelos de aterosclerosis en rata son independientes de la reducción del colesterol (50).

La rosuvastatina también ha demostrado inhibición del deterioro de la función endotelial, incremento de la biodisponibilidad del óxido nítrico sistémico e inhibición de la activación plaquetaria exagerada en un modelo de rata con insuficiencia cardiaca congestiva (51), así como mejoría en la viabilidad de la presión sanguínea y variabilidad de la frecuencia cardiaca (52).

En un modelo de ratón diabético, la rosuvastatina revierte la disminución de la relajación por acetilcolina en preparaciones de anillo de aorta aislado y cuerpo cavernoso (53).

También se ha atribuido a la rosuvastatina protección contra el estrés oxidativo inducido por nitratos (54).

La evidencia en seres humanos muestra que la rosuvastatina tiene mayor eficacia como hipolipemiente que otras estatinas (46), y los modelos animales apoyan su uso por sus efectos pleiotropicos potencialmente beneficos para el manejo del SAF. Hay que considerar que si bien las estatinas han sido útiles en prevención primaria y secundaria de enfermedad cardiovascular (55), no hay datos existentes

en relación a la prevención de trombosis en pacientes con SAF (32,33), ni la utilidad para disminuir los procesos de aterosclerosis acelerada o mejoría de la disfunción endotelial que estos pacientes presentan (56,57,58).

8. JUSTIFICACIÓN

Los modelos de estudios *in vitro* en SAF se llevan a cabo con material biológico animal ó de pacientes, con el objeto de conocer la etiopatogenia de este síndrome y explorar alternativas de tratamiento farmacológico para algunas condiciones clínicas relacionadas con activación endotelial como la aterosclerosis acelerada. En estos casos, el tratamiento anticoagulante es necesario pero no suficiente para detener la aterosclerosis, por lo que es importante determinar *in vitro* el efecto de la rosuvastatina a nivel endotelial.

En este trabajo se propone un modelo *in vitro* de SAF, en el cual las células endoteliales humanas son estimuladas con material biológico humano de individuos sanos y de pacientes con SAF, con el objeto de evaluar la expresión de VCAM-1 y de esta manera proponer el uso racional de las estatinas.

El conocimiento de los efectos de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1, la principal molécula de adhesión involucrada en los procesos de activación endotelial en aterosclerosis, plantea la posibilidad de iniciar ensayos clínicos de rosuvastatina en pacientes con SAF.

9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento actual del SAF se ha enfocado a evitar los eventos de trombosis, mediante el uso de aspirina y warfarina como recursos más ampliamente aceptados. Actualmente, existe evidencia de que en el SAF se presenta aterosclerosis acelerada y que los factores de riesgo cardiovascular tradicionales no son suficientes para explicar el desarrollo de eventos cardiovasculares en pacientes con enfermedades inmunológicas como lupus eritematoso sistémico y el mismo SAF, por lo tanto, estas enfermedades por si mismas son un factor de riesgo adicional para las complicaciones cardiovasculares. Esto sugiere que en los pacientes con SAF no sólo existe alteración en la hemostasia, si no que también se encuentran involucrados mecanismos que favorecen la aterosclerosis como un proceso inflamatorio/autoinmunitario con activación endotelial. Por otro lado, hasta el momento el tratamiento con estatinas en pacientes con SAF se considera adyuvante y está dirigido al control de los niveles de colesterol. Sin embargo a pesar de que hay evidencias del efecto pleiotrópico de las estatinas, su mecanismo de acción en SAF es poco conocido. Así, al conocer los efectos de las estatinas sobre estos procesos endoteliales, se fundamenta una posibilidad terapéutica en estos pacientes.

10. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de rosuvastatina en la expresión de molécula de adhesión VCAM-1 en células endoteliales humanas en cultivo monocapa al ser estimuladas con suero de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario?

11. OBJETIVO

Determinar el efecto de rosuvastatina en la expresión VCAM-1 en células endoteliales humanas en cultivo monocapa cuando son estimuladas con suero de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario.

12. HIPÓTESIS

La rosuvastatina disminuye la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 en células endoteliales humanas en cultivo monocapa cuando son estimuladas por suero de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario.

13. METODOLOGÍA

13.1. POBLACIÓN

Esta investigación se realizó con la colaboración de las instituciones involucradas, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INC), e Instituto Politécnico Nacional (IPN). El reclutamiento de los pacientes con SAF se llevó a cabo en el Servicio de Reumatología de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) La Raza del IMSS y en el servicio de Reumatología del INC, así como los estudios necesarios para el diagnóstico de SAF se llevaron a cabo en dichas instituciones. En el Laboratorio Multidisciplinario de la sección de Postgrado de la ESM se realizaron las técnicas de biología molecular y cultivo endotelial necesarios para el desarrollo de esta investigación.

13.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio experimental *in vitro*, transversal, abierto, comparativo con grupo control.

13.2.1. GRUPO SAF:

- Hombres ó mujeres mayores de 18 años con diagnóstico de SAF primario según los criterios de Sapporo que acudieron al Servicio de Reumatología de la UMAE la Raza y del INC.

13.2.1. GRUPO CONTROL:

- Donadores de sangre segura mayores de 18 años que aceptaron participar en el estudio cuando acudieron a donar sangre después de ser aceptados para donación de sangre segura de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-003-SSA2-1993 (59).

13.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

13.3.1 Criterios de Inclusión

- Hombres y mujeres mayores de 18 años con diagnóstico de SAF de acuerdo a los criterios de Sapporo.
- Consentimiento informado por escrito.

13.3.2 Criterios de No inclusión

- Procesos infecciosos de menos de 30 días, al momento de su inclusión al proyecto.
- Tratamiento concomitante con estatinas ó medicamentos que tengan interacciones medicamentosas con rosuvastatina tales como antiácidos, resinas ligadoras de ácidos biliares, ciclosporina, daptomicina, ezetimibe, fibratos y rifampicina.
- Falta de apego a tratamiento anticoagulante si es que lo tienen considerándose como fuera de rango de anticoagulación cuando tenían INR menor a 2 ó bien mayor a 4.
- Nivel de anticoagulación fuera de rangos terapéuticos al momento de la toma de la muestra sanguínea (INR, menor a 2 ó mayor a 4).

13.3.3 Criterios de Exclusión

- No aplican

13.4. DESCRIPCION DE VARIABLES

13.4.1 VARIABLE INDEPENDIENTE

- Rosuvastatina:
 - Tipo: cuantitativa numérica
 - Escala: continua
 - Unidad de medición: concentración micromolar [μM]
 - Descripción operativa: para fines de experimentos en cultivo se utilizó el principio activo como rosuvastatina cálcica (peso molecular 1001.14gramos/mol) en diluciones consecutivas con agua bidestilada estéril hasta obtener las concentraciones de 2.79 μM , 27.9 μM y 279 μM . El valor del “volumen de distribución” de la rosuvastatina es de 134 litros (43). Dado que este parámetro de la farmacocinética expresa la relación entre la cantidad total del fármaco en el cuerpo y la concentración en el volumen corporal plasmático o sanguíneo de un individuo promedio de 70kg, las concentraciones μM se asumen de esta

naturaleza para el calculo de las dosis correspondientes en humanos de la siguiente manera (60):

$$\text{Volumen de distribución (ml)} = \frac{\text{Cantidad dosis total } (\mu\text{g})}{\text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}$$

Al despejar se eliminan las unidades de esta forma:

Cantidad dosis total = Volumen de distribución x Concentración

$$\mu\text{g} = \frac{\cancel{\text{ml}}}{1} \times \frac{\mu\text{g}}{\cancel{\text{ml}}}$$

134 Litros = 134 000ml

Si [1M] = 1001.14g / 1litro entonces equivale a 1001140 μ g / 1ml, y aplicando regla de tres se obtienen las equivalencias de las concentraciones siguientes:

[2.79 μ M] = 2.7931806 μ g/ml,

[27.9 μ M] = 27.931806 μ g/ml, y

[279 μ M] = 279.31806 μ g/ml.

Al sustituir los valores se obtienen las siguientes dosis considerando un modelo de farmacocinética mono-compartmental con concentraciones de rosuvastatina estables:

la [2.79 μ M] da 374.2862004 μ g que son 0.374mg por dosis,

la [27.9 μ M] da 3742.862004 μ g que son 3.74mg por dosis, y

la [279 μ M] da 37428.62004 μ g que son 37.4mg por dosis.

Estudios preclínicos con dosis de 5 a 80mg en humanos muestran un comportamiento aproximadamente lineal en los parámetros principales de la farmacocinética de rosuvastatina (61) y las concentraciones máximas no se afectan por edad o sexo (43).

13.4.2 VARIABLE DEPENDIENTE

- Molécula de adhesión celular vascular -1 (VCAM-1).
 - Tipo: cuantitativa numérica

- Escala: continua
- Unidad de Medición: píxeles por área cuadrada en imagen digitalizada de acuerdo a intensidad de fluorescencia por inmunocitoquímica y confirmación de los resultados con western blot para VCAM-1 (unidades arbitrarias).

13.5. DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO

13.5.1. Obtención del material biológico SAF y control

Se obtuvo sangre total de pacientes con SAF mediante venopunción en extremidad superior previa asepsia/antisepsia y técnicas convencionales. La sangre de los controles se obtuvo de los donantes de sangre segura. Se obtuvo el suero de pacientes y controles mediante centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos en centrifuga Eppendorf 5810R. Las muestras se almacenaron a -80°C en alícuotas y se descongelaron una sola vez para los experimentos.

13.5.2. Obtención del cultivo primario

Las células endoteliales se obtuvieron de cordones umbilicales de mujeres sanas al momento de parto eutócico. El cordón umbilical se colocó en solución HANK'S (solución iónicamente balanceada) para eliminar los elementos formes de la sangre. Se disecaron los vasos del cordón umbilical y se hizo un corte longitudinal sobre la vena y el tejido por su cara interna fue removido finamente y tratado con una solución de colagenasa tipo IA y tipo IV (2mg/ml) durante 20 a 40 minutos. El sobrenadante se utilizó para la obtención del cultivo de células endoteliales. El sobrenadante se colocó en medio de cultivo Dulbecco's Eagle's modificado, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos en Eppendorf 5810R. En dicho medio se obtuvieron capas celulares las cuales se separan y lavan cada una 3 veces a través de centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y resuspensión. Finalmente las células fueron resuspendidas en medio Dulbecco's Eagle's suplementado con suero fetal bovino al 10%, factor de crecimiento endotelial (2ml/100ml de medio) y antibiótico/antimicótico (2ml/100ml de medio), y se sembraron en platillos de cultivo cubiertos con fibronectina en el mismo medio de cultivo pero suplementado con Pen-Strep-Anf. Se colocaron en una estufa Nauaire US autoflow CO₂ water-

jacketed incubator con ambiente húmedo a 37°C y concentración atmosférica de CO₂ 5% y O₂ 95%. Las células fueron caracterizadas por su morfología clásica en adoquín y por la expresión del factor de Von Willebrand por medio de inmunocitoquímica.

13.5.3. Mantenimiento de la línea celular

Para mantenimiento de la línea se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's Eagle's suplementado con suero fetal bovino, factor de crecimiento endotelial y antibiótico/antimicótico que se cambió cada 72 hrs. Las células fueron resemebradas con una densidad de 1×10^5 y se utilizaron para experimento cuando alcanzaron confluencia. Se usaron entre los pasajes 4 y 10, periodo durante el cual mantienen sus características fenotípicas endoteliales.

13.5.4. Estimulación celular

Antes de realizar el experimento las células se privaron del medio de cultivo, remplazándolo por otro medio que contenía Pen-Strep-Anfo y 0.2% de suero fetal bovino, con la finalidad de sincronizar las células en fase G₀ del ciclo celular. Al momento de iniciar el experimento se desecho por decantación el medio de cultivo, ya que las células poseen adecuada adhesividad al piso de los cubreobjetos sobre los cuales se sembraron. Posteriormente se lavaron las células 3 veces con 250µl de solución Krebs-Henseleit con pH de 7.4 a base de HEPES (K-H). Se preincubaron durante 10 min con 250µl de la misma solución anterior a 37°C para estabilizar las células con esta nueva solución. Después se agregaron 250ul de solución K-H en el caso del control, 250µl de suero sano ó suero de paciente SAF, además de una solución de principio activo de rosuvastatina a diferentes concentraciones molares como tratamiento conjunto. El tiempo de estimulación se evaluó a las 24, 48 y 72 horas ya que la expresión de moléculas de adhesión depende de la síntesis de proteínas que puede requerir de 12 hasta 72 horas para desarrollarse. Dado que encontramos mayor viabilidad celular a las 48 horas, este fue designado como tiempo de estimulación celular para todos los experimentos.

13.5.5. Inmunocitoquímica.

Se preparó la cámara de incubación colocando 50µl de albúmina sérica bovina 1.0% por cubreobjeto, por espacio de 30 minutos y en agitación. Se realizaron posteriormente 3 lavados con buffer de fosfatos 0.1M a pH=7.4 con agitación por espacio de 10 minutos. Se colocó el anticuerpo primario a una dilución 1:100, 50µl por cubreobjetos por de 1 hora a temperatura ambiente. Después, se realizaron 3 lavados con buffer de fosfatos 0.1M a pH=7.4 con agitación por espacio de 10 minutos. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario rodaminado o fluoresceinado a una dilución 1:250, 50µl por cubreobjeto, por espacio de 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, después se realizaron nuevamente 3 lavados con buffer de fosfatos 0.1M a pH = 7.4 con agitación por espacio de 10 minutos. Después, se montó el portaobjetos. La albúmina sérica bovina se disolvió con buffer de fosfatos 0.1M a pH=7.4. Posteriormente, en un portaobjetos limpio se puso media gota del protector y conservador de fluorescencia (Vectashield Mounting Medium for Fluorescent with DAPI), se colocaron dos cubreobjetos por portaobjetos y se colocaron los cubreobjetos con las células hacia abajo en contacto con la media gota del protector, se sellaron los cubreobjetos con resina (barniz) y se observaron en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TS100. El Vectashield delimitó los núcleos. Se necesitaron filtros de 535 nm para excitación y 615 nm de emisión. Todas las imágenes al mismo aumento (40x) se digitalizaron y se midió la fluorescencia como el número de píxeles de fluorescencia emitidos entre el número de píxeles de área celular en cada célula evaluada con el programa IPLab 3.7 Eval.

13.5.6. Western blot

Para corroborar los resultados de inmunocitoquímica se repitieron los experimentos con los mismos grupos de estimulación celular, grupo control, grupo SAF y SAF en presencia de Rosuvastatina a concentraciones 2.79µm, 27.9µm y 279µm. Se realizó (inmuno) western blot de cada experimento por triplicado.

Loa células después de ser estimuladas, se lisaron mediante sonicación con sonicador Branson 1210 alternando con congelación rápida en tres ocasiones consecutivas.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo con el método de Bradford, en el cual después de agregar azul de Comassie G250 se dejó reposar por 2 minutos y se determinó la absorbancia a 595nm en espectrofotómetro Beckman DU 650. Se calculó la cantidad de proteína en base a una curva tipo de albúmina bovina (62,63).

En cada caso en base a la cantidad de proteínas se tomaron 20 μ g y el volumen equivalente se agregó a un tubo Eppendorf con buffer Laemmli 1:1. Cada tubo se colocó en agua a punto de ebullición por espacio de cinco minutos e inmediatamente en hielo. De esta forma queda lista la muestra para ser cargada al gel.

Se preparó un gel de corrimiento de acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8% (3.95ml de solución de monómeros + 5ml agua bidestilada + 3ml solución reguladora de Tris-HCl pH 8.8 + 125 μ l duodecil sulfato de sodio al 10% + 5 μ l tetrametilendiamina + 75 μ l persulfato de amonio al 10%) en placas de vidrio bio-rad durante 2 horas. También se preparó gel espaciador al 4% (0.5ml solución de monómeros + 3ml agua bidestilada + 1.2ml solución reguladora de Tris-HCl pH 6.8 + 50 μ l duodecil sulfato de sodio al 10% + 2.5 μ l tetrametilendiamina + 50 μ l persulfato de amonio al 10%) en placas de vidrio durante 90 minutos.

Se montaron las placas en el tanque para electroforesis con 500ml de buffer de corrimiento 1X (Tris-Glicina-Duodecil sulfato de sodio) por tanque. Se cargó en el primer carril 5 μ l de marcador de bajo peso molecular y en el resto de los carriles las muestras correspondientes con buffer Laemmli 1:1. Se corrió a 200 volts durante 55 min a 4°C. Finalmente un gel se tiñó con solución azul brillante de Comassie R250 y se transfirió el segundo gel a una membrana de nitrocelulosa a 12 volts por 35 minutos. La membrana transferida se tiñó con Rojo de Ponceau durante 10 minutos. Posteriormente se cortó en bandas la membrana transferida y se bloquearon los sitios inespecíficos con leche Svelty 8% durante 60 minutos en agitación continua en agitador Polimax 1040 Heidoph a 10 rpm. Se decantó la leche y se agregaron anticuerpos primarios de ratón monoclonales contra VCAM-1 y anticuerpos primarios de cabra policlonales IgG contra Proteína Ribosomal Subunidad 6 (RSP6), ambos en una dilución 1:100 por 3 horas en agitación a 10

rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados por cinco minutos cada uno en agitación continua a 10 rpm con solución PBS 1X-tween 0.05%. Después se aplicaron anticuerpos secundarios bovinos anti-ratón y anti-cabra IgG, ambos 1:1000, por 60 minutos en agitación a 10 rpm. Al término nuevamente se realizaron 3 lavados más. Finalmente se revelaron las bandas mediante método colorimétrico con (5mg diaminobencidina + 10ml PBD + 5 μ l perhidrol) por 10 minutos y posteriormente se realizó el análisis densitométrico para cada experimento con Digital Imaging System IS-1000.

13.5.7. Datos clínicos y de laboratorio.

Los datos clínicos de los pacientes con SAF y de los controles se tomaron por interrogatorio directo y exploración física inmediatamente antes de la toma sanguínea. En todos los casos se revisó el expediente clínico para verificar los valores de laboratorio al momento del diagnóstico.

Se extrajeron del expediente de pacientes con SAF los valores de AL, anticuerpos aCL IgG e IgM, y en caso de ser negativos se les determinó anticuerpos anti β 2GP1. A todos los pacientes se les determinó velocidad de sedimentación, proteína C reactiva, factor reumatoide, anticuerpos antinucleares (ANA), especificidades para anti DNAdc, SSA/Ro, SSB/La, RNP y Sm, así como fracciones del complemento C3 y C4, prueba VDRL (investigación por laboratorio de enfermedad venereas del inglés "venereal disease research laboratory"), complemento hemolítico 50%, biometría hemática con diferencial de formula blanca, tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina activada, INR, glucosa, creatinina, ácido úrico, albúmina sérica, transaminasas, bilirruibinas, examen general de orina, depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 horas.

Las determinaciones se llevaron a cabo con equipo Laboratory Instrument -1800 de acuerdo a los estándares de operación y calidad del Laboratorio Central y del Laboratorio de Reumatología de la UMAE La Raza del IMSS así como del Laboratorio de Inmunología del INC.

13.6. MÉTODO DE OBSERVACIÓN

Abierto.

13.7. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Los experimentos de cultivo celular se realizaron por triplicado por cada paciente. Se consideró un número arbitrario de 10 pacientes por grupo en forma inicial en este estudio pivote, con reajuste de n de acuerdo a la diferencia de medias. Se determinó la diferencia de medias de la expresión de moléculas de adhesión, con base en su desviación estándar, considerando un poder estadístico del 80% con valor alfa de 0.05 con la siguiente formula (64):

$$n = 2 \left(\frac{(Z_{\alpha} - Z_{\beta}) \sigma}{\mu_1 - \mu_2} \right)^2$$

Valor Z de $\alpha = 1.96$

Valor Z de $\beta = -0.84$

Valor $\sigma = 20.7$ pixeles/área para el caso de VCAM-1 grupo control

$\mu_1 = 136.3$ pixeles/área para grupo SAF

$\mu_2 = 69.3$ pixeles/área paragrupo control

Se consideró la desviación estándar observada de mayor magnitud en pixeles/área. Se sustituyeron los valores de la siguiente forma:

$$n = 2 \left(\frac{(1.96 - (-0.84)) (20.7)}{136.3 - 69.3} \right)^2 = 1.49670822$$

Se calculó por redondeo $n = 2$ pacientes mínimo por grupo, por lo que se consideraron adecuados los resultados de los ensayos iniciales. Cabe señalar que los estudios previos en donde se ha utilizado HUVEC estimulado por fracciones IgG de anticuerpos anticardiolipinas y anti β_2 GPI se llevaron a cabo con $n=6$ y $n=2$ pacientes con SAF respectivamente (40,42), así como $n=10$ para el caso del grupo control en el estudio de anticardiolipinas IgG. En este estudio con base en la

asignación consecutiva a los grupos se consiguieron 16 pacientes con SAF y 12 controles sanos.

13.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de inmunocitoquímica (píxeles/área) y de western blot (unidades arbitrarias) se expresan en promedios \pm desviación estándar (SD). La comparación entre los grupos de las diferencias de expresión de moléculas de adhesión se realizó con t de Student. Los datos clínicos de los pacientes se expresan como porcentajes para las variables cualitativas nominales y se expresan como promedios \pm SD para las variables cuantitativas. Se realizó comparación de variables demográficas y somatométricas entre los pacientes con SAF y los controles. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05 tanto para los datos de inmunocitoquímica y western blot como para los datos clínicos de los pacientes y controles. Se utilizó el programa SPSS 11.0.

13.9. ASPECTOS ÉTICOS

Para la obtención del suero humano se requirió de la punción de una vena periférica del paciente. Ello se realizó sólo en caso de ser otorgado el consentimiento informado por escrito de los pacientes con SAF y de los individuos del grupo control.

El procedimiento riesgoso al cual se expuso el paciente fue la venopunción de vena periférica. Esta maniobra confirió riesgo mínimo al estudio, ya que potencialmente puede haber discreta afectación del retorno venoso en caso de seccionar incidentalmente la vena, o bien hematoma local. Nunca se realizó la venopunción si había datos de diátesis hemorrágica por anticoagulación en caso de que el paciente se encontrara con tratamiento anticoagulante, ni se hacía venopunción si tenía antecedentes de eventos vasculares en dicha extremidad superior. En el caso de los individuos del grupo control se tomó una muestra sanguínea durante el protocolo de donación sin mayor invasión que la que confiere el proceso de donación sanguínea per se.

Durante el estudio no se presentaron eventos relacionados con la venopunción.
Este proyecto fue autorizado por los Comités de Ética de las Instituciones correspondientes.

14. RESULTADOS

14.1. EFECTO DEL SUERO DE LOS PACIENTES CON SAF PRIMARIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULA DE ADHESION VASCULAR-1

La exposición de las células endoteliales en cultivo monocapa a suero de pacientes con SAF produjo mayor expresión de VCAM-1 en comparación con los niveles basales de su producción cuando sólo fueron estimuladas con suero de paciente sano.

Las células endoteliales se observaron con mayor intensidad cuando fueron estimuladas con suero de pacientes con SAF (figura3) que cuando fueron estimuladas con suero de individuos sanos (figura2). Las imágenes digitalizadas mostraron 69.3 ± 14.3 píxeles/área (promedio \pm desviación estándar) para las células expuestas al suero de individuos sanos y mostraron 136.3 ± 20.7 píxeles/área para las células expuestas al suero de pacientes con SAF (tabla3). El análisis de los datos mostró diferencias estadísticamente significativas con valores de $p < 0.001$ entre estos dos grupos (gráfica1).

VCAM-1 (píxeles/área)	Control (n=12)	SAF (n=16)
Promedio	69.3*	136.3*
Desviación estándar	14.3	20.7
Error estándar	3.98	3.7
IC 95%	60.6-78	128.5-144.0
Mínimo-Máximo	47.2-98.8	85.8-174.0

Tabla 3. Efecto del suero control y del suero SAF sobre la expresión de VCAM-1. La comparación entre los grupos se realizó con t de Student, $p < 0.001$.

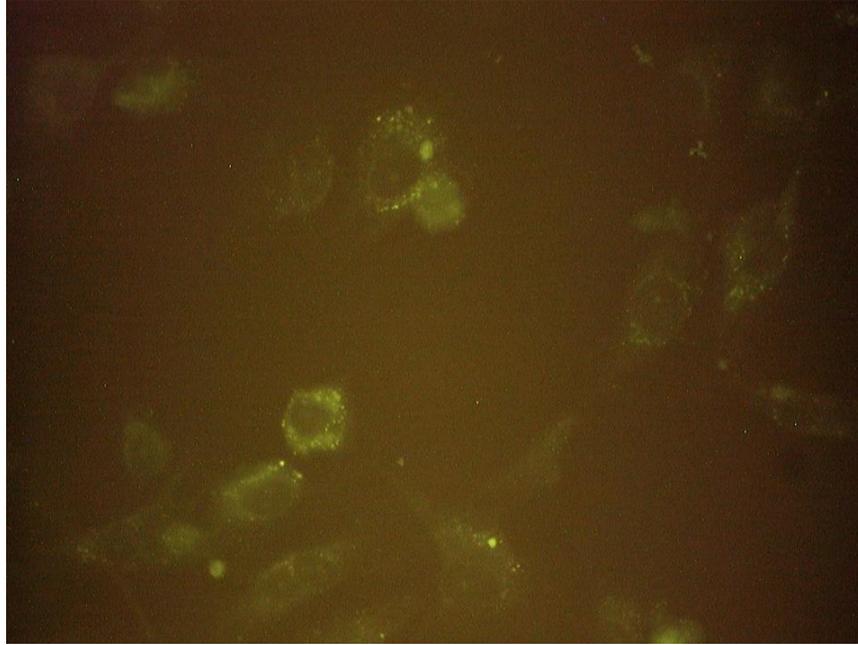


Figura 2. Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero control con inmunocitoquímica para VCAM-1. Se utilizó anticuerpo fluoresceinado (40x).

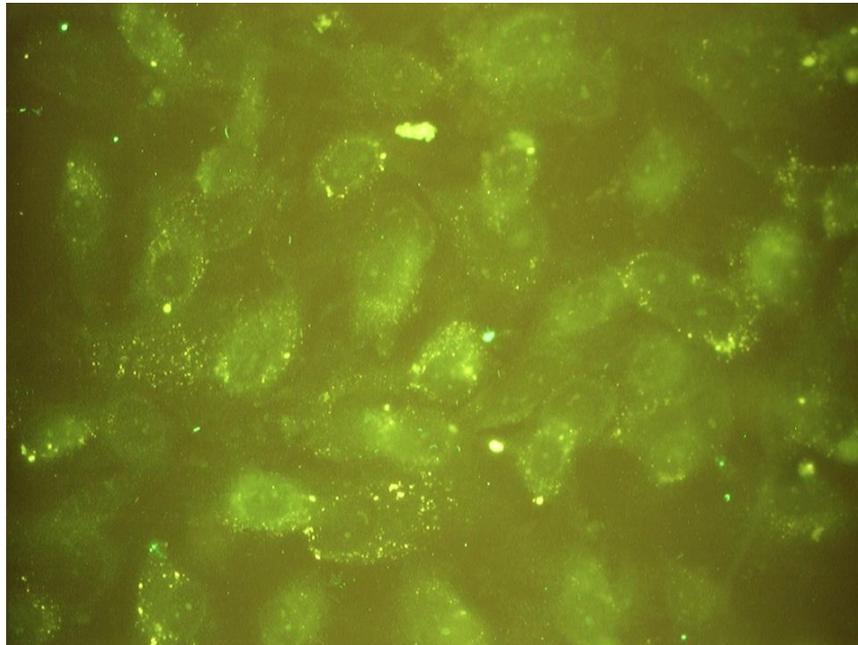
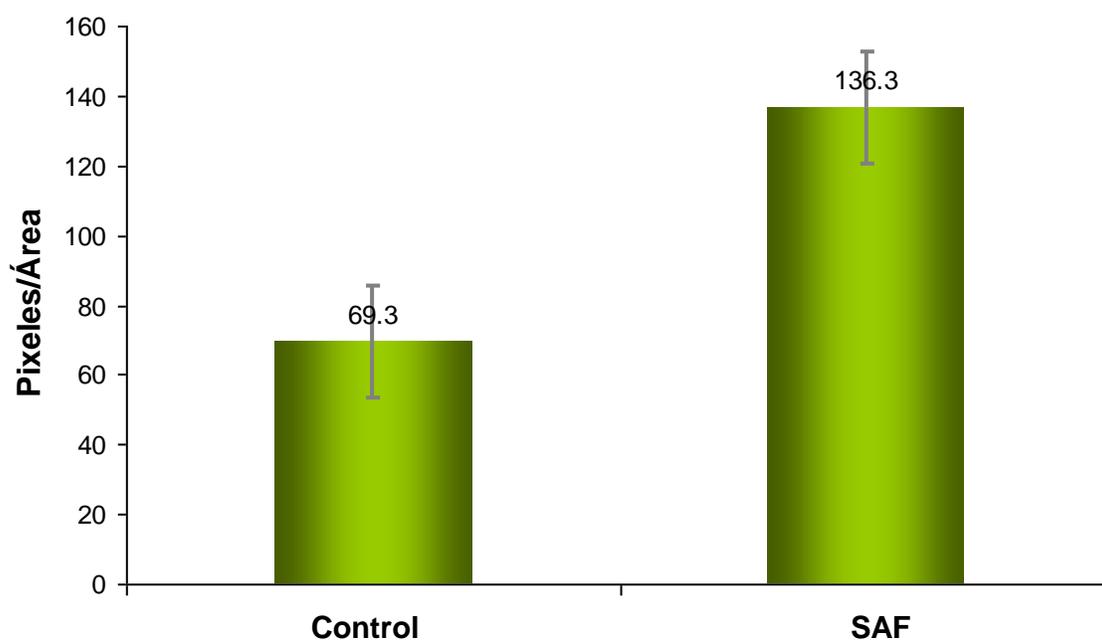


Figura 3. Imagen representativa de células endoteliales expuestas a suero SAF con inmunocitoquímica para VCAM-1. Se utilizó anticuerpo fluoresceinado (40x).

Expresión de VCAM-1



Gráfica 1. Efecto del suero control y SAF en la expresión de VCAM-1 medida por inmunocitoquímica. Cada barra representa media \pm error estándar, la comparación entre ambos grupos se realizó con prueba t de Student, $p < 0.001$.

14.2. EFECTO DE ROSUVASTATINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE VCAM-1 EVALUADA POR INMUNOCITOQUÍMICA

Para evaluar el efecto de rosuvastatina sobre las expresión de VCAM-1 inducida por el suero SAF se realizaron paralelamente, la estimulación con control (figura4A) y SAF (figura4B) así como experimentos con SAF y rosuvastatina a concentraciones micromolares crecientes de 2.79 μ M (figura4C), 27.9 μ M (figura4D) y 279 μ M (figura 4E).

La adición de rosuvastatina disminuyó, en forma progresiva, la intensidad de fluorescencia medida por la cantidad de pixeles/área en cada imagen digitalizada mostrando 29.27 \pm 2.44 pixeles/área para el grupo control, 143.4 \pm 19.17 para el grupo SAAF, así como, 113.7 \pm 19.53, 95.68 \pm 3.38 y 79.91 \pm 4.34 pixeles/área para el caso de rosuvastatina 2.79 μ M, 27.9 μ M y 279 μ M respectivamente (tabla4).

Se realizó análisis entre el grupo control y grupo SAF (gráfica2) con la prueba t de Student encontrando diferencias significativas así como entre el grupo SAF y el grupo estimuladas por suero SAF + rosuvastatina 279 μ M ($p < 0.005$).

	Control	SAF	SAF + Rosuvastatina 2.79μM	SAF + Rosuvastatina 27.9 μM	SAF + Rosuvastatina 279μM
n	12	16	16	16	16
Promedio	29.27*	143.4*	113.7	95.68	79.91*
Desviación estándar	2.44	19.17	19.53	3.38	4.34
Error estándar	0.08	7.24	8.73	1.95	2.50

Tabla 4. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 estimulada por el suero SAF medida por inmunocitoquímica.

*La comparación entre el grupo control y SAF, así como entre SAF y Rosuvastatina 279 μ M se realizó por la prueba t de student, $p < 0.005$.

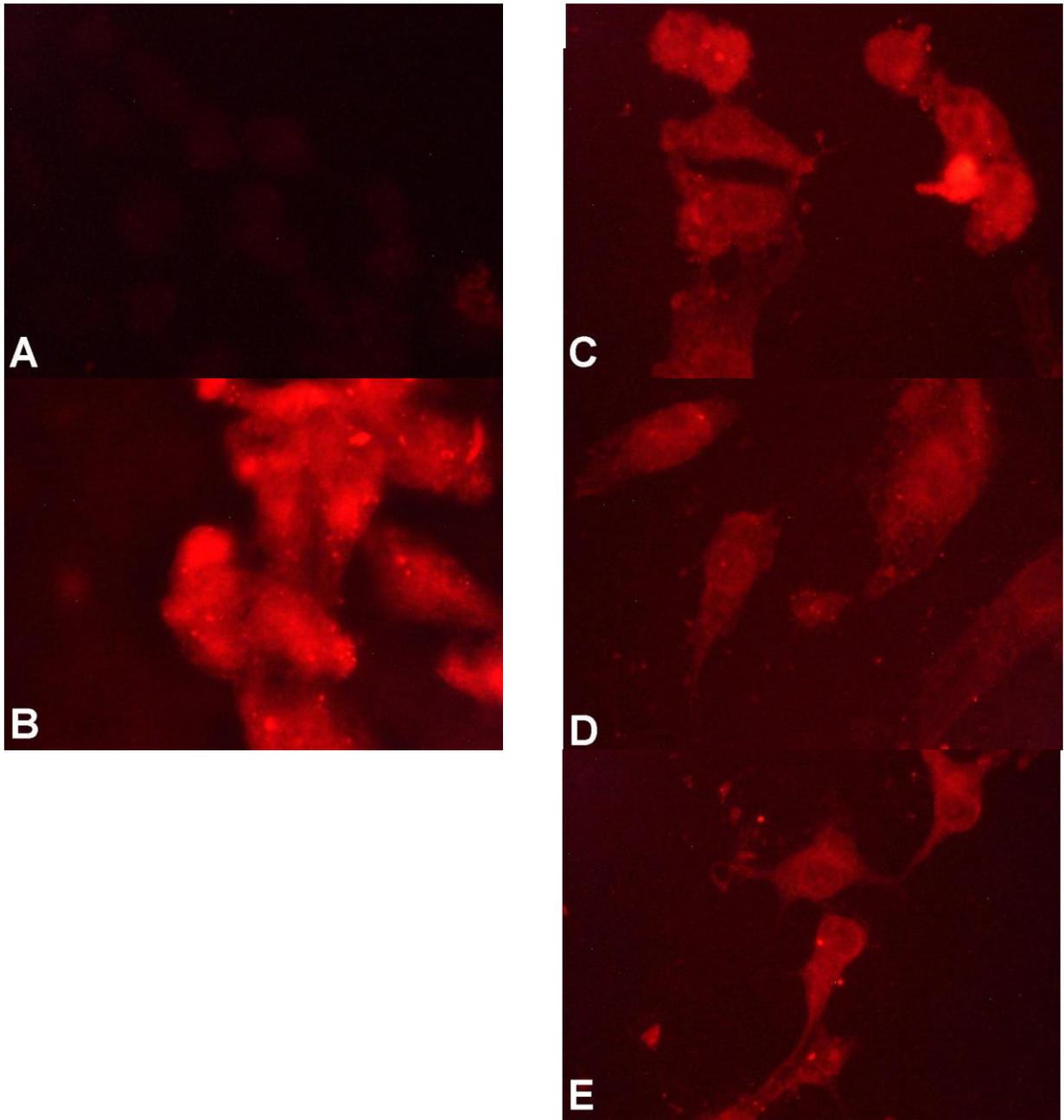
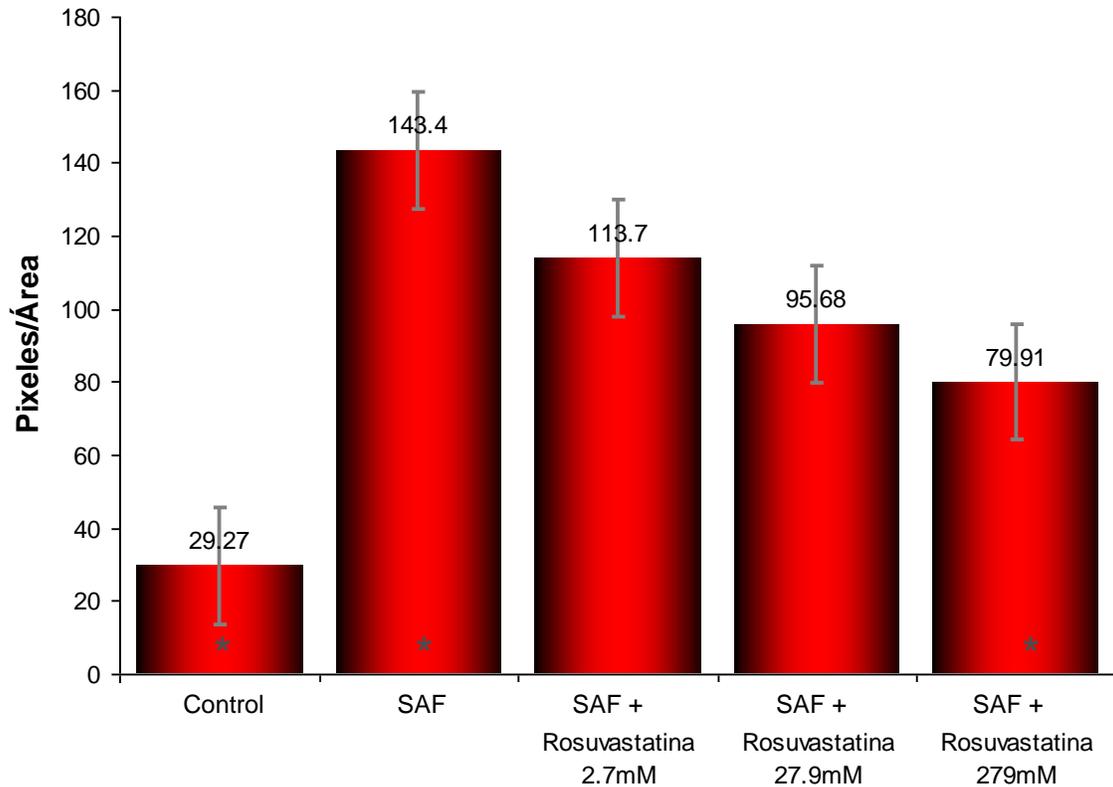


Figura 4. Imágenes representativas del efecto de suero control (A), suero SAF (B), y suero SAF en presencia de rosuvastatina a concentraciones $2.79\mu\text{M}$ (C), $27.9\mu\text{M}$ (D) y $279\mu\text{M}$ (E). Inmunocitoquímica indirecta 40x.

Efecto de Rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1



Gráfica 2. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 estimulada por suero SAF evaluada mediante inmunocitoquímica. Cada barra representa la media \pm error estándar, $p < 0.005$ entre el grupo control y el grupo SAF así como entre el grupo SAF y el grupo SAF + Rosuvastatina 279 μ M. La comparación entre estos grupos se realizó con t de Student, $p < 0.005$.

14.3. EFECTO DE ROSUVASTASTINA SOBRE LA EXPRESION DE VCAM-1 EVALUADA POR WESTERN BLOT

Para determinar la expresión de VCAM-1 mediante western blot se repitió la estimulación de células endoteliales de cordón umbilical humano en cultivo monocapa con estimulación de suero control, suero SAF, así como suero SAF y concentraciones creciente de rosuvastatina 2.79, 27.9 y 279 micromolares (figura5).

Se observó que los niveles de unidades arbitrarias de western blot aumentaron con la estimulación del suero SAF (0.405 ± 0.04) en comparación con el suero control (0.380 ± 0.04) con una diferencia significativa de $p < 0.005$. Además, el nivel de unidades arbitrarias de western blot estimuladas por la presencia del suero SAF disminuye en presencia de rosuvastatina, específicamente en el caso de la concentración $279 \mu\text{M}$ de rosuvastatina (0.371 ± 0.03) en la cual se observaron diferencias significativas en relación con la estimulación del suero SAF con un valor de $p < 0.005$ (tabla5, gráfica 3).

Western blot (unidades arbitrarias)	Control	SAF	SAF + Rosuvastatina $2.79 \mu\text{M}$	SAF + Rosuvastatina $27.9 \mu\text{M}$	SAF + Rosuvastatina $279 \mu\text{M}$
Promedio	0.38015*	0.4057*	0.3895	0.38041	0.37176*
Desviación estándar	0.042	0.048	0.038	0.035	0.036
Error estándar	0.0175	0.0184	0.0145	0.0134	0.015

Tabla 5. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 estimulada por suero SAF y cuantificada con western blot. La comparación entre grupos se realizó con t de Student, $p < 0.005$ entre grupo control y grupo SAF así como grupo SAF y SAF en presencia de rosuvastatina $279 \mu\text{M}$.

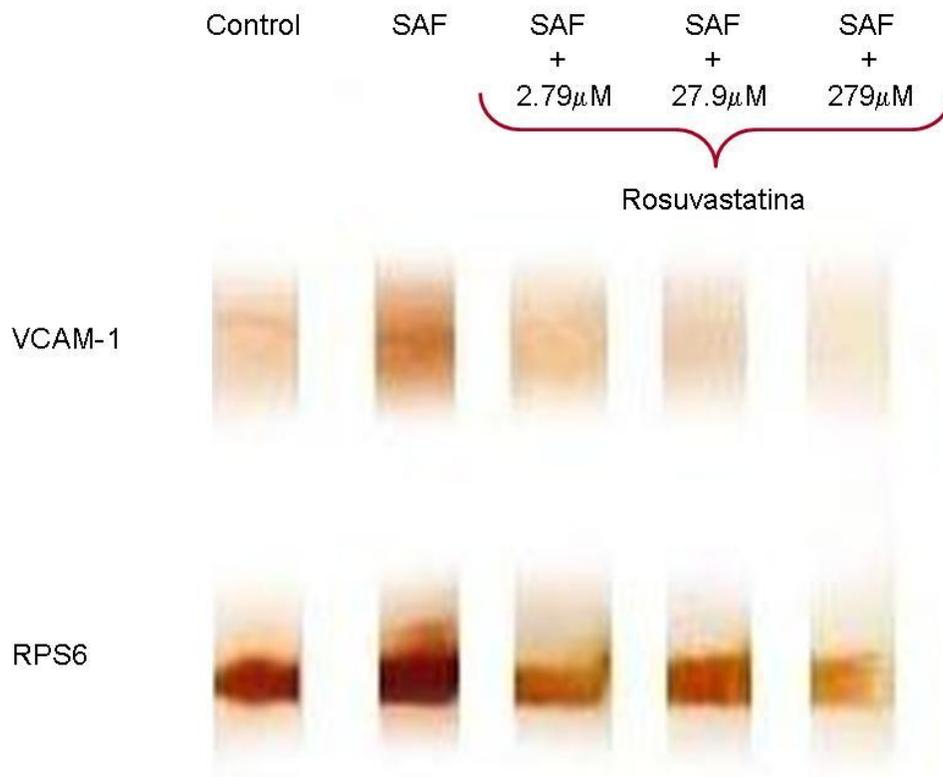
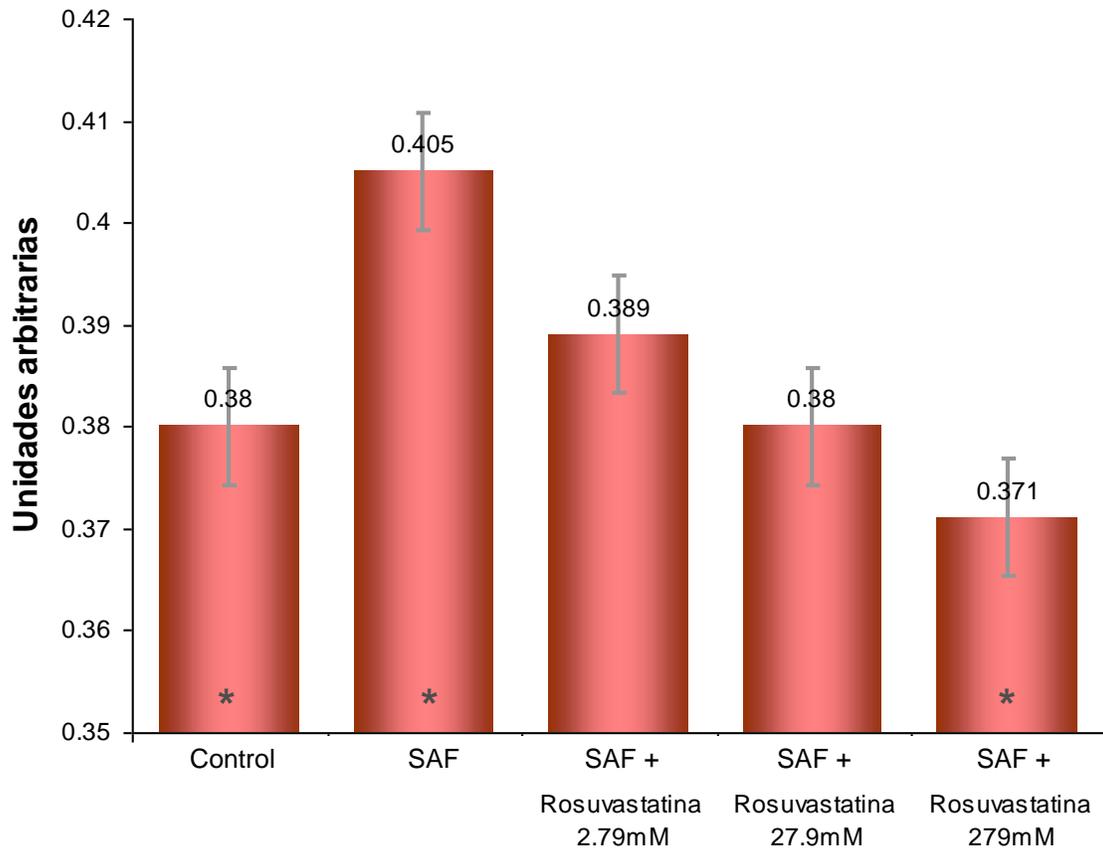


Figura 5. Imagen representativa de tiras de gel de la técnica de western blot. De izquierda a derecha en el primer carril se muestra el resultado del gel del control, el siguiente suero SAF y posteriormente suero SAF más rosuvastatina a 2.79 μ M, 27.9 μ M y 279 μ M respectivamente.

Expresión de VCAM-1 Western Blot



Gráfica 3. Efecto de rosuvastatina sobre la expresión de VCAM-1 estimulada por suero SAF evaluada mediante western blot. n = 6 representa número de repeticiones del experimento. Cada barra representa la media \pm error estándar, $p < 0.005$ entre el grupo control y el grupo SAF así como entre el grupo SAF y el grupo SAF en presencia de rosuvastatina 279 μ M.

14.4. DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON SAF Y CONTROLES

Se incluyeron 16 pacientes con SAF (13 mujeres) y 12 controles (8 mujeres). Los pacientes con SAF fueron de mayor edad que los controles. No hubo diferencias significativas entre los controles y los pacientes con SAF respecto a peso, talla, índice de masa corporal, cintura, cadera, índice cintura cadera (tabla6).

VARIABLE	SAF (n=16)		CONTROLES (n=12)		
	Promedio	SD	Promedio	SD	valor p
Edad (años)	47.81	12.35	38.08	6.8	0.02
Peso (kilos)	71.83	13.03	75.62	12.76	0.47
Talla (cm)	160.07	10.59	163.08	7.39	0.42
Índice de masa corporal	32.98	11.22	35.68	10.92	0.55
Cintura (cm)	90.5	7.72	92.5	8.54	0.68
Cadera (cm)	99.5	10.08	103.25	5.31	0.34
Índice cintura/cadera	0.91	0.05	0.89	0.57	0.6

Tabla 6. Datos demográficos y somatométricos de los pacientes con SAF y los controles. SD, desviación estándar.

Los pacientes con SAF tenían alrededor de 10 años de diagnóstico y presentaron en promedio 3 eventos vasculares trombóticos de los cuales predominaron los eventos arteriales en relación a los venosos 2:1 aproximadamente. Con respecto a los antecedentes gineco-obstétricos, la misma cantidad de número de gestaciones sobrepasa mínimamente el promedio del número de abortos, y las pérdidas fetales ocurrieron alrededor de la 16ª semana de gestación.

De las manifestaciones clínicas asociadas a SAF sólo los síntomas neurológicos, valvulopatías y HAP moderada fueron más frecuentes. Los síntomas neurológicos reportados en la mayoría de los pacientes fueron cefalea migrañosa (5/16), seguida de hemiparesia como secuela de EVC (2/16), y amaurosis fugax por neuritis óptica retrobulbar (1/16). Las principales valvulopatías encontradas fueron doble lesión mitral (2/16), insuficiencia mitral (2/16) ó insuficiencia tricuspídea (5/16) e insuficiencia aórtica (1/16), sólo un paciente tenía comunicación

interauricular del tipo ostium secundum. El 25% de los pacientes con SAF no tenía ninguna enfermedad concomitante, el resto cursaba con por lo menos una enfermedad concomitante como hipertensión arterial sistémica (6/16), diabetes mellitus (2/16), obesidad mórbida (1/16), hipotiroidismo (3/16) depresión (3/16), neuropatía crónica obstructiva (3/16), arteriosclerosis carotídea (2/16), hipertrigliceridemia (2/16), hipoplasia renal derecha (1/16), laberintopatía vascular (1/16), púrpura trombocitopénica (1/16), síndrome quiasmático por adenoma hipofisiario (1/16), fibromialgia (2/16), cardiopatía reumática inactiva (1/16) y púrpura trombocitopénica (1/16). Al momento de la toma sanguínea todos los pacientes se encontraban en control de sus enfermedades concomitantes. Ningún paciente con SAF presentó corea, úlceras en la extremidades ni SAF catastrófico (tabla 7).

El 93.8% se encontraba anticoagulado con acenocumarina, sólo una paciente con manifestaciones puramente obstétricas se encontraba en vigilancia con tratamiento a base de aspirina, el resto de los pacientes anticoagulados tenían INR de $2,74 \pm 0.56$. Las muestras sanguíneas se tomaron antes de la dosis siguiente de sus tratamientos médicos.

VARIABLE	SAF		
	n =16	Promedio	SD
Eventos vasculares totales		3.07	1.94
Eventos vasculares arteriales		2.36	1.68
Eventos vasculares venosos		1.54	1
Gestaciones		2.6	1.22
Pérdidas fetales		2.2	1.09
Preeclampsia		1.25	0.5
Años de diagnóstico		10.4	3.7
Livedo	3		
Valvulopatía	6		
Hipertensión arterial pulmonar	6		
Síntomas neurológicos	7		
Anticardiolipina IgG	15		
Anticardiolipina IgM	3		
Anticoagulante lúcido	1		
Anti β 2GPI	1		
VDRL falso positivo	4		
ANA positivos	3		
C3 (mg/dl)		113.96	20.44
C4 (mg/dl)		16.82	5.11
Complemento hemolítico 50% (UH)		160	113
Velocidad de sedimentación globular (mm/h)		19.8	12.57
Proteína C reactiva (mg/dl)		0.42	0.32
INR		2.74	0.56
Tiempo de protrombina (s)		29.7	10.9
Tiempo parcial de tromboplastina activada (s)		65.58	33.4
Colesterol total (mg/dl)		196	39.64
Colesterol HDL (mg/dl)		43.2	6.61
Colesterol LDL (mg/dl)		130.4	32.5
Triglicéridos (mg/dl)		178.85	83.88
Hemoglobina (g/dl)		14.98	1.48
Hematocrito (%)		43.37	4.62
Leucocitos/mm ³		6439	1759
Linfocitos/mm ³		1809	440
Neutrófilos/mm ³		3866	1171
Monocitos/mm ³		378	56
Eosinófilos/mm ³		211	108
Basófilos/mm ³		5.7	1.4
Plaquetas/mm ³		226000	91138

Tabla 7. Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con SAF.

ANA, anticuerpos antinucleares; C3, fracción del complemento C3; C4, fracción de complemento C4; INR, índice de anticoagulación; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; β 2GP1, beta 2 glicoproteína I;

VDRL, venereal disease research laboratory; UH, unidades de hemólisis; s, segundos.

15. DISCUSIÓN

El síndrome de anticuerpos antifosfolípidos constituye la principal trombofilia adquirida. Se caracteriza por el desarrollo de un estado protrombótico autoinmune en el cual se sugiere que hay una activación continua del endotelio la cual favorece la asociación con eventos trombóticos, en territorios arteriales y venosos poco usuales, así como pérdidas fetales recurrentes. El diagnóstico del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos se establece si el paciente cumple por lo menos un criterio clínico y un criterio de laboratorio de los criterios de Sapporo (4,5). Se denomina SAF secundario cuando se encuentra asociado a otra enfermedad reumatológica y se le llama primario cuando no se asocia a ninguna entidad sistémica autoinmune. En el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, tanto primario como secundario, se han demostrado alteraciones en la función endotelial por tomografía por emisión de positrones (56). También se ha demostrado que los pacientes con SAF primario tienen engrosamiento de la íntima y de la media de las carótidas como manifestación de aterosclerosis temprana. De interés, estos cambios ultrasonográficos se asociaron con un riesgo de 3 veces más para desarrollar evento vascular cerebral (26).

La activación endotelial se caracteriza por la expresión de fenotipos endoteliales que pueden ser necesarios para la función normal de determinado territorio vascular, sin embargo, se pueden presentar de manera exagerada dando lugar a procesos fisiopatológicos o bien en territorios donde normalmente no se lleva a cabo determinada actividad endotelial. Por ejemplo, las células endoteliales de piel no inflamada expresan constitutivamente P selectina, mientras que las células endoteliales de otros territorios, como las células endoteliales de mesenterio, expresan P selectina sólo cuando son activadas (65).

Por lo tanto no se deben utilizar como sinónimos “actividad” y “activación” endotelial. Dado que la actividad endotelial se da en el organismo para mantener la homeostasis haciendo alusión al mantenimiento adecuado de la función endotelial, y la activación se puede dar en respuesta a un estímulo fisiológico adaptativo o bien en el contexto de enfermedad; que para fines de este trabajo es al cual nos referimos.

En el SAF se ha propuesto que los anticuerpos antifosfolípidos son los responsables de la activación endotelial que favorece el fenotipo ateroesclerótico y protrombótico (14,28).

Los anticuerpos antifosfolípidos son moléculas inmunoreactivas capaces de reaccionar contra moléculas que contienen fosfolípidos (2). Diversos estudios *in vitro* han analizado el efecto que tienen los anticuerpos antifosfolípidos sobre las células endoteliales. Existen modelos animales en los cuales se han desarrollado anticuerpos capaces de producir SAF en roedores a partir de la inoculación de citomegalovirus (29).

Los mecanismos propuestos para la activación endotelial incluyen la expresión de moléculas de adhesión como P-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 entre otras moléculas de adhesión (30). Específicamente se ha encontrado aumento de E-selectina en HUVEC estimulado por anti β 2GPI a través del factor nuclear NF- κ B (40) de una manera similar a la que sucede con citocinas proinflamatorias. Además, se ha propuesto que HUVEC activadas pueden producir IL1-beta que pueden actuar de manera autocrina y favorecer el proceso de activación endotelial. Se ha propuesto que los aFL favorecen la activación endotelial mediante la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina (22).

En humanos se ha demostrado que la IgG anti cardiolipina y anti β 2GPI estimulan la expresión de E-selectina e ICAM-1 en HUVEC (40,41,42).

Dado que la VCAM-1 es una de las moléculas de adhesión más estudiadas en el proceso de activación endotelial y relacionada con la presencia de aterosclerosis extendida (19,66) ya sea en HUVEC como en su forma circulante (20), se decidió evaluar la expresión de VCAM-1 en células endoteliales vasculares de cordón umbilical humano provenientes de mujeres sanas cuando en condiciones *in vitro* se estimularon por la presencia de suero SAF y suero control toda vez que hay evidencia de disfunción endotelial con aterosclerosis acelerada en los pacientes con SAF primario bien documentada. En estos pacientes, las concentraciones de VCAM-1 se han asociado a la gravedad de los eventos trombóticos (21).

Nuestro estudio muestra que el suero de pacientes con SAF comparado con el suero de individuos sanos tiene la capacidad de estimular en forma significativa VCAM-1, una molécula de adhesión celular que refleja activación endotelial.

Este hallazgo confirma otros estudios que sugieren el hecho de que los anticuerpos antifosfolípidos tienden a aumentar la expresión de moléculas de adhesión como uno de sus mecanismos patogénicos, tanto *in vivo* como *in vitro* (22,30,40). Gharavi y colaboradores demostraron activación endotelial mediante la expresión de P selectina y VCAM-1 en un modelo animal de roedor con aumento por ELISA de estas moléculas, así como, determinaron desde un punto de vista funcional un aumento del 7 al 24% en la adhesión leucocitaria en los cultivos de HUVEC previamente expuestos a fracciones de anticuerpos IgG antifosfolípidos obtenidos del modelo animal. En nuestros experimentos encontramos 96% de aumento en la expresión de VCAM-1 evaluada por inmunocitoquímica. En el estudio de Gharavi y colaboradores, los anticuerpos antifosfolípidos fueron obtenidos de roedores con infección por citomegalovirus, la exposición a ellos produjo aumento de VCAM-1 con diferencias significativas. En el trabajo de Meroni y colaboradores se encontró también aumento de la expresión de moléculas de adhesión E-selectina e ICAM-1 en HUVEC al estimularlas con fracciones de IgG anti β 2GPI. También en el trabajo de Dunoyer y colaboradores, así como en el estudio de Ferrara y colaboradores, se observó aumento de la expresión de VCAM-1 y E-selectina por la presencia de fracciones IgG de anticuerpos anticardiolipinas y anti β 2GP1 respectivamente. En estos últimos trabajos se utilizaron fracciones IgG de anticuerpos ya provenientes de material biológico humano pero con pocos pacientes.

Los estudios previos (40,42) en donde se ha utilizado HUVEC estimulado por fracciones IgG de anticuerpos anticardiolipinas y anti β 2GPI se llevaron a cabo con n=6 y n=2 pacientes con SAF respectivamente, así como n=10 para el caso del grupo control en el estudio de anticardiolipinas IgG. En nuestro estudio se incluyeron 16 pacientes con SAF y 12 controles sanos. Inicialmente, se calculó un tamaño de muestra n=2 con base en la fórmula para diferencias de medias tomando en cuenta una diferencia de 67 pixeles/área en los primeros

experimentos. Sin embargo considerando la gran variedad de asociaciones de manifestaciones clínicas que puede presentar un mismo paciente con SAF, decidimos aumentar el tamaño de muestra en forma consecutiva hasta obtener por lo menos en el grupo SAF dos pacientes mínimo con manifestaciones clínicas semejantes, para agregar peso al significado clínico a este modelo.

En nuestro trabajo se propone un modelo *in vitro* de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos utilizando el suero total de los pacientes con SAF para estimular a las células endoteliales en cultivo, dado que existe evidencia previa de que la activación endotelial puede ser desencadenada por la presencia de los anticuerpos antifosfolípidos (40,41,42). La principal ventaja operativa de este modelo sencillo es que no necesita de la purificación de los anticuerpos antifosfolípidos del suero de los pacientes, ya que se utiliza suero total, tanto de los pacientes como de los sujetos control. Es importante recalcar que uno de los objetivos implícitos de este estudio es ver si realmente hay activación endotelial por el mismo suero total de los pacientes, sin ninguna extracción de sus componentes, y de esta manera proponer un modelo simple para la evaluación inicial de otras alternativas de tratamiento farmacológico con una aproximación holística a lo que puede suceder en el espacio intravascular en un modelo *in vitro* con material biológico humano.

Actualmente el tratamiento médico del SAF se encuentra sólo enfocado al estado protrombótico de esta enfermedad. Se hace hincapié en controlar los factores de riesgo trombótico modificables en el paciente. Sin embargo, no debemos dejar de considerar la evidencia actual acerca de los procesos de aterosclerosis acelerada que estos pacientes tienen, tomando en cuenta también que en sí misma la aterosclerosis puede ser un proceso altamente relacionado con otros procesos inflamatorios (14,18).

Así, el endotelio se encuentra activado persistentemente en los pacientes con SAF, sin traducir estrictamente un proceso inflamatorio agudo como en el caso de las vasculitis con infiltrado inflamatorio, pero sí favoreciendo aterosclerosis y trombosis mediante la perpetuación de un fenotipo trombótico y activación endotelial. Este conocimiento nos permite comprender más porque los pacientes

con SAF y probablemente otras enfermedades inmunológicas tienen procesos de aterosclerosis acelerada, y por ello los factores de riesgo cardiovascular tradicionales de Framingham no alcanzan a estimar adecuadamente el riesgo de eventos cardiovasculares en estos pacientes.

El tratamiento farmacológico del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos se basa en el uso de anticoagulantes orales, aspirina ó heparina para contrarrestar el efecto protrombótico de esta enfermedad (31,32,33). Así, generalmente se usan anticoagulantes orales, pero el nivel de anticoagulación óptimo aun se encuentra en discusión, tanto por la misma efectividad de niveles altos (INR 3 a 4) y bajos (INR 2.5 a 3) de anticoagulación en la prevención secundaria de eventos cardio y cerebrovasculares como por los efectos adversos (31,34).

A pesar de que el tratamiento anticoagulante tiene utilidad contra el estado protrombótico persistente en esta enfermedad, manifestaciones como la aterosclerosis temprana y las valvulopatías asociadas a SAF no reciben un tratamiento específico y la terapia anticoagulante no evita su progresión (67). Por ello es importante determinar modelos *in vitro* en donde se pueda llevar a cabo una exploración inicial farmacológica. Actualmente se propone que los efectos pleiotrópicos de las estatinas podrían ser potencialmente benéficos para proponer a este grupo de medicamentos como una alternativa al tratamiento actual de los pacientes con SAF.

Al momento se han estudiado varias estatinas en modelos de enfermedades autoinmunes sistémicas, por ejemplo, simvastatina, cerivastatina, atorvastatina, pravastatina, y fluvastatina (36,37,38,39,48). Esta última en modelos de SAF específicamente por varios grupos con resultados muy interesantes (40,41,42).

En un estudio (42) la fluvastatina incremento la expresión de VCAM-1 y E-selectina en células endoteliales; sin embargo en otro estudio (40) se observó disminución de VCAM-1, ICAM-1 y E selectina. Estos resultados aparentemente contradictorios pueden deberse al efecto pleiotrópico de las estatinas. De hecho se ha demostrado que la fluvastatina puede estimular el aumento del RNA mensajero de estas moléculas de adhesión en HUVEC en respuesta al tratamiento con anticuerpos antifosfolípidos IgG. En nuestro estudio sólo analizamos el efecto

de la rosuvastatina sobre VCAM-1, por lo tanto es posible que puedan observarse resultados diferentes con la expresión de otras moléculas como E-selectina e ICAM-1. Los mecanismos exactos de inhibición de VCAM-1 por rosuvastatina deben ser más analizados.

La rosuvastatina tiene un efecto protector en un modelo *in vivo* de microvasculatura mesentérica de rata perfundida con trombina 0.5u/ml, en el cual se atenuó el rodamiento, adherencia y migración leucocitaria (47). Además se reporta por los mismos autores, que la rosuvastatina disminuye la expresión de E-selectina, y aumenta la liberación de óxido nítrico. Este último efecto se ha corroborado al encontrar aumento en la expresión de eNOS en un modelo de enfermedad cerebrovascular en ratas hipertensas (48), en donde también se demostró disminución en la expresión de P-selectina por la rosuvastatina. Además, revierte el daño por isquemia cerebral focal inducido por activador de plasminogeno tisular (49). Sus efectos en modelos de aterosclerosis en rata son independientes de la reducción del colesterol (50).

En el caso de SAF se ha demostrado activación endotelial con anticuerpos antifosfolípidos, sin embargo, la respuesta a una misma concentración de fluvastatina 5 μ M fue diferente dependiendo del tipo de anticuerpo antifosfolípido que se utilizó para estimular a HUVEC. En el estudio de Dunoyer y colaboradores HUVEC se expuso a fracciones IgG de anticardiolipinas y observo aumento de la expresión basal de VCAM-1 y paradójicamente en el trabajo de Moroni y colaboradores la misma concentración de fluvastatina produjo disminución de la expresión de E-selectina e ICAM-1 cuando se estimularon las células de HUVEC con fracciones IgG de anti- β 2GP1. Nuestros resultados muestran aumento de la expresión de VCAM-1 con la estimulación por si sola de suero de pacientes con SAF y existe además, disminución de tal expresión en presencia de rosuvastatina a concentraciones crecientes. Aunque sólo alcanzó diferencia significativa en la concentración de 279 μ M del tratamiento de HUVEC con rosuvastatina, se observa tendencia en forma gradual de manera concentración dependiente. Estos resultados se observaron por inmunocitoquímica de manera semicuantitativa al

disminuir comparativamente el número de píxeles por área celular; y se confirmaron con western blot, obteniendo también diferencias significativas.

El rango de dosis utilizadas en nuestro estudio cubren las dosis correspondientes a dosis equimolares a trabajos previos (40,41,42) con fluvastatina, y se encuentran en concentraciones similares en modelos animales *in vivo* (47) para los cuales al trasladar concentraciones a seres humanos están rangos libres de toxicidad (43,68). Nuestro estudio demuestra también que la adición de rosuvastatina al cultivo de células endoteliales activadas por el suero de pacientes con SAF, produce una inhibición significativa de VCAM-1 a una concentración máxima de 279 μ M. Esta concentración equivale a una dosis terapéutica poco menor a 40mg.

Los mecanismos por los cuales probablemente se realiza el aumento de la expresión de VCAM-1 pueden estar relacionados con los efectos pleiotrópicos de las estatinas. Tales efectos no dependen de su capacidad hipolipemiente, sino de efectos que se desarrollan independientemente ó prematuramente a la inhibición de la síntesis de colesterol (35).

Se ha propuesto que las vías involucradas probablemente están en relación a la nitrosilación de proteínas por aumento de óxido nítrico (35,54) ó bien mediante de activación de segundos mensajeros de los sistemas de Ras y Rho cinasas asociadas a proteínas G (35, 69). Las Rho cinasas se han asociado a enfermedad cardiovascular, hipertensión, EVC, inflamación y enfermedades en donde se involucra alteración de la función endotelial. Se propone que se las vías de la Rho cinasa disminuyen mediante la inhibición de la síntesis de colesterol por las estatinas al inhibir la formación de intermediarios isoprenoides tales como el farnesilpírofosfato y el geranilgeranilpírofosfato (69). Llama la atención que algunos procesos dependientes de Rho cinasas se encuentran acoplados probablemente a factor nuclear FN- κ B y habrá que definir su real interacción respecto a rosuvastatina, pero eso escapa a los objetivos iniciales de este trabajo. Otro hallazgo, para el cual este modelo no fue diseñado, pero se observó durante el desarrollo operativo, fue la presencia de cambios morfológicos de las células endoteliales que podrían sugerir tendencia a senescencia y muerte celular. Los experimentos iniciales de estimulación celular se realizaron a las 24, 48 y 72

horas, la mayor expresión de moléculas de adhesión durante la estandarización de técnicas en el laboratorio se llevó a cabo a las 48 horas, por lo que los experimentos se realizaron también en dicho periodo de tiempo para dar oportunidad al proceso de las síntesis de moléculas de adhesión que por lo regular se expresan de las 12 a las 48 horas (16,17,70). Encontramos mayor viabilidad de las células endoteliales en los experimentos tanto con suero SAF y suero control entre las 24 y 48 horas a diferencia de los experimentos con estimulación de 72 horas especialmente para el grupo SAF. Los cambios morfológicos observados en las células endoteliales expuestas al suero SAF podrían sugerir apoptosis, lo que abre la posibilidad de confirmar en estudios posteriores la tendencia de muerte programada del endotelio en presencia de anticuerpos antifosfolípidos como se ha propuesto previamente (28).

En la mayoría de los estudios se utilizaron anticuerpos antifosfolípidos purificados. En nuestro trabajo utilizamos el suero total, lo que sugiere que no sólo el anticuerpo antifosfolípido aislado de su medio natural, sino el suero en su totalidad, es capaz de activar a las células endoteliales favoreciendo de esta manera el proceso inflamatorio en forma constante. La relevancia de este hallazgo justifica el empleo de estatinas independientemente del perfil de lípidos de estos pacientes con el objeto de tener un efecto benéfico antiinflamatorio y antiaterogénico. De hecho, ninguno de los pacientes incluidos tenía hiperlipidemia ni tabaquismo, aunque había algunos hipertensos y diabéticos.

Una de las limitantes más importante de los modelos *in vitro* es la gran variabilidad de las manifestaciones clínicas de los pacientes, los cuales, en nuestro estudio tienen por lo menos diferencias significativas respecto a la edad y la distribución de los pacientes por sexo en el grupo SAF y el grupo control. Recientemente se ha corroborado que el sexo de los pacientes con SAF primario puede tener algunas diferencias clínicas (71) por lo que será conveniente igualar la distribución por sexo en futuras investigaciones. Otra de las limitantes de este modelo está también relacionada con el amplio espectro de manifestaciones clínicas que los pacientes tiene en relación a los sujetos control, ya que estos últimos son donadores sanos de acuerdo a la norma oficial mexicana para donación de sangre

segura (59) que excluye algunas enfermedades concomitantes en los pacientes con SAF. Cabe mencionar que al diseño de este estudio escapa el objetivo de correlación con variables clínicas de los pacientes con SAF ya que se trata de un modelo *in vitro* como exploración inicial de fármacos con potencial beneficio en esta enfermedad. No obstante esta última limitante también aporta una ventaja, ya que en la realidad de la práctica clínica reumatológica, los pacientes con SAF se presentan de esa forma, con una gran gama de manifestaciones. Por ello se amplió la muestra de los pacientes con SAF de tal manera que por lo menos la mayoría de las manifestaciones se tuvieran en el grupo de SAF en dos ocasiones de acuerdo al número de muestra calculado para la expresión de moléculas de adhesión en pixeles/área.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la rosuvastatina disminuye la expresión de VCAM-1 estimulada con el suero de pacientes SAF, y se corroboró tanto por inmunocitoquímica como por western blot. También nuestros resultados sugieren que hay modificaciones en la expresión de VCAM-1 en la célula endotelial cuando se expone a la presencia del suero SAF al compararlos con suero control, por lo que lo proponemos como un modelo *in vitro* simple de síndrome de anticuerpos antifosfolípidos en el cual se pueden probar alternativas de tratamiento médico. De esta manera, se pueden explorar *in vitro* varias modalidades farmacológicas para el tratamiento del SAF, y así, justificar ensayos clínicos con mayor base racional y seguridad, toda vez que hay aun resultados contrarios respecto al aumento ó disminución de moléculas de adhesión (40,42). Es muy importante aprovechar con seguridad los potenciales efectos benéficos de las estatinas en los pacientes con SAF, ya que se evitaría la activación endotelial persistente que ocurre en esta enfermedad, así como se puede incidir a la vez en la presencia de aterosclerosis temprana.

Estos hallazgos *in vitro* sugieren que determinadas estatinas como la rosuvastatina deben formar parte del arsenal terapéutico de pacientes con SAF. Sin embargo, es necesario confirmar estos hallazgos en estudios clínicos controlados.

16. CONCLUSIONES

El suero de pacientes con SAF aumenta la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 en células endoteliales humanas en cultivo monocapa.

La expresión de VCAM-1 de células endoteliales en cultivo monocapa estimuladas por el suero de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos disminuye en presencia de rosuvastatina.

La disminución de VCAM-1 de células endoteliales en cultivo favorecida por la rosuvastatina sugiere que podría estabilizar la función celular y la activación endotelial probablemente a través de sus efectos pleiotrópicos independientemente de la disminución de colesterol.

Las propiedades pleiotrópicas de la rosuvastatina podrían tener importancia clínica en el tratamiento de los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos de caracterizarse adecuadamente sus efectos en relación a la activación endotelial por anticuerpos antifosfolípidos.

17. GLOSARIO

aCL	Anticuerpos anticardiolipina
aFL	Anticuerpos antifosfolípidos
AL	Anticoagulante lúdico
Anf	Anfotericina
Apo	Apolipoproteína
β 2GPI	Beta 2 glicoproteína I
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil indol
dl	Decilitro
DNAdc	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
ELISA	Ensayo enzimático estandarizado inmunoabsorbente
h	Hora
HANK'S	Solución de Hank
HEPES	Compuesto amortiguador a base de aminas orgánicas
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular -1
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IMC	Índice de masa corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INC	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
INR	Internacional index ratio
IPN	Instituto Politécnico Nacional
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
mm	Milimetro
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
μ M	Micromolar

nm	Nanómetro
Pen	Penicilina
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
rpm	Revoluciones por minuto
RPS6	Subunidad 6 de la proteína ribosomal
s	Segundos
SAF	Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos
SD	Desviación estándar
Sm	Antígeno Smith
SSA/Ro	Antígeno SSA/Ro contra proteínas no histonas asociadas a RNA nuclear
SSB/La	Antígeno SSB/La contra proteínas no histonas asociadas a RNA nuclear
Strep	Estreptomina
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UH	Unidades de hemólisis
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular -1
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

18. BIBLIOGRAFÍA

1. Erkan D and Lockshin MD. **Antiphospholipid syndrome**. Curr Opin Rheumatol 2006;18:242-8.
2. Durrani O, Gordon C and Murray P. **Primary antiphospholipid syndrome (APS): current concepts**. Surv Ophthalmol 2002;47(3):215-38.
3. Bulckaen H, Puiseux F, Bulckaen E, et al. **Antiphospholipid antibodies and the risk of thromboembolic events in vascular heart disease**. Mayo Clinic Proc 2003;78:294-8.
4. Wilson W, Gharavi A, Koike T, et al. **International consensus statement on the preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome**. Arthritis and Rheumatism 1999; 42(7):1309-11.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. **International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)**. J Thromb Haemost 2006;4:295-306.
6. Nahass G. **Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid antibody syndrome**. J Am Acad Dermatol 1997;36(2):149-68.
7. Vianna J, Khamastha M, Ordi-Ros J et al. **Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: A european multicenter study of 114 patients**. Am J Med 1994;96(1):3-9.
8. Soltész P, Veres K, Lakos G, et al. **Evaluation of clinical and laboratory features of antiphospholipid syndrome: a retrospective study of 637 patients**. Lupus 2003;12:303-7.
9. Gómez-Puerta J, Martín H, Amigo MC, et al. **Long term follow-up in 128 patients with primary antiphospholipid syndrome, do they develop lupus?** Medicine 2005;84:1-6.

10. Belmont M. **Catastrophic antiphospholipid syndrome**. In: Khamastha M editor. Hughes syndrome. 2a ed. London UK: Springer; 2006. p. 171-180.
11. Asherson RA and Cervera R. **Catastrophic antiphospholipid syndrome**. Curr Rheumatol Rep 2003;5(5):395-400.
12. Erkan D, Asherson RA, Espinosa G, et al. **Long term outcome of catastrophic antiphospholipid syndrome survivors**. Ann Rheum Dis 2003;62:530-3.
13. Gharavi AE, Wilson W and Pierangeli S. **The molecular basis of the antiphospholipid syndrome**. Lupus 2003;12:579-83.
14. Jara L, Medina G, Vera-Lastra O, and Shoenfeld Y. **Atherosclerosis and antiphospholipid syndrome**. Clinical Reviews in Allergy and Immunology 2003;25:79-87.
15. Sáenz E. **Moléculas de adhesión celular**. Revista de Medicina Interna Concepción 1997; 1(1):6-4.
16. Frenette P y Wagner D. **Molecular medicine adhesion molecules – part I**. NEJM 1996;334(23):1526-9.
17. Frenette P y Wagner D. **Adhesion molecules – part II: blood vessels and blood cells**. NEJM 1996;335(1):43-5.
18. Libby P, Ridker P, and Meseri A. **Inflamation and atherosclerosis**. Circulation 2002;105:1035-43.
19. Nakay K, Kawazoe K, Miura Y, et al. **Concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlated with expression of VCAM-1 mRNA in the human atherosclerotic aorta**. Coron Artery Dis 1995;6(6):497-502.
20. Karlheinz P, Nawroth P, Conradt C, et al. **Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating Intercellular Adhesion**

- Molecule-1, E-Selectin, P-Selectin, and Thrombomodulin.** *Arter, Thromb Vasc Biol.* 1997;17:505-12.
21. **Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, et al. Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis.** *Arthritis Rheum* 2000;43(1):55-64.
22. **Pierangeli S, Espinola R, Liu X, et al. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by Intercellular Cell Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, and P-Selectin.** *Circ Res* 2001;88:245-50.
23. **Szmitko P, Wang C, Weisel R, et al. New markers of inflammation and endothelial cell activation, part I.** *Circulation* 2003;108:1917-23.
24. **Szmitko P, Wang C, Weisel R, et al. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation, part II.** *Circulation* 2003;108:2041-8.
25. **Sherer Y and Shoenfeld Y. Immunomodulation for the treatment and prevention of atherosclerosis.** *Autoimmunity Rev* 2002;1:21-7.
26. **Medina G, Casaos D, Jara L, et al. Increases carotid artery intima-media thickness may be associated with stroke in primary antiphospholipid syndrome.** *Ann Rheum Dis* 2003;62:607-10.
27. **Hörkkö S, Olee T, Mo L, et al. Anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid antibody syndrome recognize epitopes in both β_2 -glycoprotein 1 and oxidized low-density lipoprotein.** *Circulation* 2001;103:941-50.
28. **Meroni PL, Raschi E, Tesloni C, et al. Antiphospholipid antibodies and the endothelium.** *Rheumatic Disease Clinics of North America* 2001;27(3):587-61.

29. Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, et al. **GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activated endothelial cell *in vivo* and *in vitro*.** J Immunol 1999;163:2922-7.
30. Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, et al. **Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activations of endothelial cells *in vivo*.** Arthritis Rheum 2002;46(2):545-52.
31. Lockshin M and Erkan D. **Treatment of the antiphospholipid syndrome.** N Engl J Med 2003;349:1177-9.
32. Erkan D and Lockshin M. **New treatments for antiphospholipid syndrome.** Rheum Dis Clin Am 2006;32:129-48
33. Lim W, Crowther M and Eikelboom J. **Management of antiphospholipid syndrome, a systematic review.** JAMA 2006;295(9):1050-7.
34. Crowther M, Ginsberg J, Julian J, et al. **A comparison of two intensities of warfarin for prevention of recurrent thrombosis in the patients with the antiphospholipid syndrome.** N Engl J Med 2003;349:1133-8.
35. Calabro P and Yeh E. **The pleiotropic effects of statins.** Curr Opin Cardiol 2005;20:541-6.
36. Kaneider N, Egger P, Dunzendorfers D, et al. **Reversal of thrombin-induced deactivation of CD39/ATPDasa in endothelial cells by HMG-CoA reductasa inhibition.** Atheroscler Thromb Vasc Biol 2002;22:894-900.
37. Yousset S, Stüve O, Patarroyo J, et al. **The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatina, promotes a Th2 bias and reverse paralysis in the central nervous system autoimmune disease.** Nature 2002;420:78-84.

38. Bernot D, Benoliel AM, Peiretti F et al. **Effect of atorvastatin on adhesive phenotype on human endothelial cells activated by tumor necrosis factor alfa.** J Cardiovasc Pharmacol 2003;41:316-324.
39. Kohka H, Mori S, Iwagaki H, et al. **Differential effect of LFA703 pravastatin, and fluvastatin on production of IL-18 and expression of ICAM-1 and CD40 in human monocytes.** J Leukoc Biol 2005;77:1-8.
40. Meroni P, Raschi E, Testoni C, et al. **Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti- β 2-glycoprotein I) antibodies.** Arthritis Rheum 2001;44(12):2870-8.
41. Ferrara D, Liu X, Espinola R, et al. **Inhibition of the thrombogenic and inflammatory properties of antiphospholipid antibodies by fluvastatine in an *in vivo* animal model.** Arthritis Rheum 2003;48(11):3272-9.
42. Duyoner-Greinde S, Dimitrova Y, Satta N y cols. **Fluvastatin increase the expression of adhesion moléculas, monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in HUVEC stimulated by patient IgG fractions containing antiphospholipid antibodies.** Thromb Haemost 2005;93(2):339-45.
43. Core data sheet **CRESTOR**™ 17 Junio 2003 versión actualizada en Enero 2007.
44. Alsheikh A, ambrose M, Kuvin T, et al. **The safety or rosuvastatain as used in common clinical practice, a post marketing analysis.** Circulation 2005;111:3051-7.
45. Martin P, Warkick M, Dane A, et al. **Proprieties and pharmacokinetic of rosuvastatin: studio phase I con 10 masculine voluntaries.** Clinical Therapeutics 2003;25(10):2553-63.
46. McKenney. **Efficacy and safety of rosuvastatin in treatment of dyslipidemia.** Am J Health-Syst Pharm 2005;62:1033-47.

47. Stalker T, Lefer A, and Scalia R. **A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid.** British Journal of Pharmacology 2001;133:406-12.
48. Sironi L, Gianazza E, Gelosa P, et al. **Rosuvastatin, but not Sinvastatine, provides end-organ protection in stroke-prone rats by anti-inflammatory effects.** Thromb Vasc Biol 2005;25:598-603.
49. Kilic E, Kilic U, Matter C, et al. **Aggravation of focal cerebral ischemia by tissue plasminogen activator is reversed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor but does not depend on endothelial NO synthase.** Stroke 2005;36:332-6.
50. Kleemann R, Princen H, Emeis J, et al. **Rosuvastatin reduces atherosclerosis development beyond and independent of its plasma cholesterol-lowering effect in APOE*3-Leiden transgenic mice.** Circulation 2003;108:1368-74.
51. Schäfer A, Fraccarollo D, Eigenthaler M, et al. **Rosuvastatin reduces platelet activation in heart failure, role of NO bioavailability.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1071-7.
52. Pelat MP, Dessy C, Massion P, et al. **Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E^{-/-} mice in vivo.** Circulation 2003;107:2480-6.
53. Nangle M, Cotter M, and Cameron N. **Effects of rosuvastatin on nitric oxide-dependent function in aorta and corpus cavernosum of diabetic mice.** Diabetes 2003;52:2396-2402.
54. Otto A, Fontaine D, Fontaine J, et al. **Rosuvastatin treatment protects against nitrate-induced oxidative stress.** J Cardiovasc Pharmacol 2005;46(2):177-84.

55. Ridker P. **Rosuvastatin in the primary prevention of cardiovascular disease among patients with low levels of low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein.** Circulation 2003;108:2292-7.
56. Alexanderson E, Ricalde A, Vargas A, et al. **Ammonia-PET scan in the assessment of endothelial function in patients with primary antiphospholipid syndrome.** J Nuclear Cardiol 2005;12(2):S69.
57. Mercanoglu F, Erdogan M, Oflaz H. **Impaired brachial endothelial function in patients with primary antiphospholipid syndrome.** Int J Clin Pract 2004;58(11):1003-7.
58. Barón MA, Khamastha MA, Huges GRV and D'Cruz PD. **Prevalence of an abnormal ankle-brachial index in patients with primary antiphospholipidic syndrome: preliminary data.** Ann Rheum Dis 2005;64: 144-6.
59. Dirección general del centro nacional de transfusión sanguínea. **Norma oficial mexicana NOM-003-SSA2-1993, para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.** Diario Oficial de la Federación. México (April 20th 1994).
60. Wilkinson GR. Pharmacokinetics. In: Hardman JG, Limbird LE and Goodman-Gilman A, editors. **Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics.** 10a ed. USA, McGraw-Hill, 2001. p.3-29.
61. McTaggart F, Buckett L, Davidson R, et al. **Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor.** Am J Cardiol 2001;87(5A):28B-32B.
62. Bradford M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.** Anal Biochem 1976;72:248-54.

63. Sedmark J, Grossberg S. **A rapid, sensitive, and vesatile assay for protein using comassie brilliant blue G250.** Anal Biochem 1977;79:544-552.
64. Dawson Beth and Trapo Robert G. **Bioestadística médica.** 3a edición. El manual moderno, México, 2002. 170-171 p.p.
65. Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, et al. **Specialized contributions by alpha (1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leucocyte rolling in dermal microvessels.** Immunity 2002;12(6):665-76.
66. Rhonde, Lee, Rivero et al. **Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis.** Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998;18:1765-1770.
67. Zavaleta NE, Montes RM, Soto ME, Amigo MC. **Primary antiphospholipid syndrome: a 5-year transesophageal echocardiographic followup study.** J Rheumatol 2004;31(12):2402-7.
68. Alsheikh-Ali A, Ambrose MS, Kevin JT, Karas RH. **The safety of rosuvastatin as used in common clinical practice, a postmarketing análisis.** Circulation 2005;111:3051-7.
69. Rikitake Y and Liao J. **Rho GTPases, statins and nitric oxide.** Circ Res 2005;97:1232-5.
70. Abbas A and Litchman A. **Inmunología celular y molecular.** 5a edición. Madrid, 2003, Elsevier. 562 p.p.
71. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Barile L. **The impact of gender on clinical manifestations of primary antiphospholipid syndrome.** . Lupus 2005;14(8):607-12.