UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUIMICOFARMACOBIOLOGIA

TESIS:

INDICE DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA EN PACIENTES SOMETIDOS A ANGIOPLASTIA CORONARIA Y TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICOFARMACOBIOLOGO

PRESENTA

p.Q.F.B. FATIMA MONTZERRAT CAMPOS CUADROS

ASESOR:

D. en C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

MORELIA MICHOACAN FEBRERO DE 2011

GLOSARIO DE TERMINOS

Plaqueta. Célula derivada de la fragmentación de la línea megacariocotica juegan un papel fundamental en la Hemostasia iniciando la formación de coágulos o trombos.

Clopidogrel. Agente antiagregante plaquetario perteneciente a la familia de las tienopiridinas utilizado para prevenir episodios arterioescleróticos.

Citometria de flujo. Es una técnica de análisis de las características de las células midiéndolas por dispersión de luz y fluorescencia.

Lista de abreviaturas

ICP intervención coronaria percutánea

SCA síndrome coronario agudo

IRP índice de reactividad

ECCVM eventos cardio cerebro vasculares mayores

VASP fosfoproteína estimulada por vasodilatadores

ADP adenosin difosfato

Gp glucoproteina

INDICE

CONTENIDOS

1. RESUMEN..... 1,2

2. INTRODUCCION..... 3

3. ANTECEDENTES

3.1 Plaquetas 4-7

3.2 Principales agentes antiplaquetarios..... 8-15

3.3 Indice de Reactividad Plaquetaria..... 16,17

3.4 La Citometria de flugo en en estudio de plaquetas..... 18-22

4. JUSTIFICACION..... 23

5. HIPOTESIS..... 23

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General..... 24

6.2 Objetivo Especifico..... 24

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Sitio de Estudio..... 25

7.2 Material..... 26

7.3 Metodologia..... 27-29

7.4 Analisis..... 30,31

8. RESULTADOS..... 32-45

9. DISCUSION..... 46-48

10. CONCLUSIONES..... 49

11. BIBLIOGRAFIA....... 50

INDICE DE TABLAS

1. Antigenos plaquetarios cuantificables por citometria de flujo…… 21
2. Preparacion de los tubos y de la muestra…… 29
3. Permeabilizacion celular e inmunomarcaje…… 29
4. Caracteristicas demográficas de los pacientes…… 33
5. Antecedente heredofamiliares patológicos…….. 34
6. Indices de reactividad plaquetaria (toma basal y 24 horas) …… 35

INDICE DE FIGURAS

1. Morfologia plaquetaria(organelos plaquetarios)…….. 6
2. Mecanismo de acción del Clopidogrel…… 9
3. Fosforilacion del VAsp e inhibición plaquetaria inducida por clopidogrel…….. 17
4. Formacion de las regiones para la evaluación de las muestras por medio de la citometria de flujo…… 31
5. Expresión de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP-P) en plaquetas de pacientes tratados con Clopidogrel. Mostrando una buena respuesta de inhibición plaquetaria …… ……..36-39
6. Expresión de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP-P) en plaquetas de pacientes tratados con Clopidogrel. Mostrando una mediana respuesta inhibición plaquetaria …… 39-42
7. Expresión de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP-P) en plaquetas de pacientes tratados con Clopidogrel. Mostrando una muy deficiente respeusta inhibición plaquetaria …….. 42-45

1. RESUMEN

ANTECEDENTES. La intervención coronaria percutánea (ICP) es un tratamiento que se aplica a pacientes que presentan isquemia miocárdica (flujo sanguíneo inadecuado al corazón) o infarto de miocardio (ataque al corazón). El objetivo de la ICP es abrir (desobstruir) una arteria coronaria (vaso sanguíneo que transporta sangre y oxigeno al musculo del corazón) y restaurar el flujo sanguíneo. La lesión que la propia intervención coronaria percutánea (ICP) provoca en la pared arterial poner en marcha la activación y agregación plaquetarias. Por este motivo todos los pacientes deben estar eficazmente antiagregados durante y después de la intervención. La combinación de clopidogrel mas aspirina es hoy día el tratamiento antiplaquetario oral estándar para los pacientes tratados con ICP.

JUSTIFICACIÓN. Existe una población de pacientes con enfermedad arterial coronaria que presenta baja respuesta al tratamiento con Clopidogrel, lo cual se ha asociado con eventos cardiocerebro vasculares mayores (ECCVM) en lapsos cortos de tiempo que comprometen la vida del paciente, provocado por un estado de activación plaquetaria que conllevan a una trombosis. Este problema ha llegado a ser tan importante que se ha acuñado el término “resistencia” al Clopidogrel.

HIPÓTESIS. Existe una inhibición de la actividad plaquetaria al tratamiento con Clopidogrel en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a cateterismo cardiaco.

OBJETIVO. Evaluar la actividad plaquetaria al tratamiento con Clopidogrel, en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a cateterismo cardiaco a partir de la técnica de fosforilación de VASP por citometria de flujo.

METODOS. Estudio en el cual participaron 32 pacientes sometidos a ICP. La determinación de índice de reactividad plaquetaria (IRP) fue realizada a través de la técnica de fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) por citometria de flujo.

RESULTADOS.

Un total de 31 pacientes fueron incluidos en el presente estudio. De los 31 pacientes 9 eran del sexo femenino (F) (29.03%) y 22 del sexo masculino (M) (70.96%). De estos, 19(61.29%) eran diabéticos (DM) , 23 (74.19%) de nuestros pacientes presentaban hipertensión arterial (HAS), con antecedentes de tabaquismo lo presentaron 20 (64.51%), con dislipidemia 23 (74.19%) de los pacientes, y solo 6 (19.35%) tenían antecedentes familiares de afección cardiovascular en la familia.

CONCLUSIONES.

Al termino de este estudio finalizado con un total de 31 pacientes de los cuales solo 6 pacientes (19.35%) estuvieron arriba de nuestro punto de corte de un 69% tanto en toma basal como la toma de 24 horas no fueron buenos respondedores al tratamiento con Clopidogrel en dosis entre 400 y 600 mg. Mas del 80.64 % de nuestros pacientes fueron buenos respondedores a su tratamiento con Clopidogrel presentando una significativa inhibición de la reactividad plaquetaria.concluyendo asi que nuestra terapia dual de nuestros antiplaquetarios es efectiva en la mayoría de los casos y en el caso del Clopidogrel podría estandarizarse el uso de dosis mayores a la usual para los casos de nuestros pacientes sometidos a una angioplastia coronaria.

2. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas desempeñan un papel clave en la aparición de las complicaciones tromboticas en pacientes con síndromes coronarios agudos (SCA) o en los tratados con intervenciones coronarias percutáneas (ICP). Esto ha establecido el uso generalizado de agentes antiplaquetarios, como el Acido Acetilsalicilico, las tienopiridinas (ticlopidina y Clopidogrel) y los antagonistas de los receptores de la glicoproteína IIb/IIIa, en la prevención de las enfermedades isquémicas coronarias. Sin embargo en los últimos años se han acumulado datos que indican que un número considerable de pacientes continua presentando complicaciones tromboticas a pesar de cumplir el tratamiento antiagregante plaquetario combinado de Ácido Acetilsalicilico y Clopidogrel.

Este fenómeno se ha atribuido en parte a una inhibición insuficiente de una o ambas dianas de los antiagregantes plaquetarios orales, la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1) en el caso del Ácido Acetilsalicilico y el receptor $P2Y_{12}$ del ADP en el caso del Clopidogrel, y que se ha denominado “resistencia” a los fármacos antiagregantes plaquetarios.

3. ANTECEDENTES.

3.1 PLAQUETAS

Las plaquetas son discos de forma elipsoidal que como todas las demás células sanguíneas provienen de una célula hematopoyética (stem) fuente o tronco multipotente que da lugar a la línea megacariocitica.

Estas células se forman en la medula ósea por la fragmentación del citoplasma de una célula poliploide, el megacariocito.

El recuento normal de plaquetas es de 150 a 450 x 10^9/L y tienen como función principal la de prevención y detección de la pérdida de sangre del torrente circulatorio.

Citoesqueleto Plaquetario

Es el responsable de mantener la estabilidad de la membrana, su forma discoide y las modificaciones morfológicas que estas experimentan cuando son activadas.

El esqueleto citoplasmático. Contiene una alta proporción de actina, la proteína más abundante en la plaqueta. En la plaqueta en reposo esta actina se encuentra formando filamentos que tienen uniones cruzadas con otras proteínas, lo que condiciona la formación de una malla tridimensional que funciona como un esqueleto celular.

El Esqueleto de Membrana. Esta formado también por filamentos de actina y se encuentra dispuesto inmediatamente por debajo de la membrana celular, este sistema es el responsable de mantener la estabilidad de la membrana y capacita al complejo glucoproteico Ib-IX en su unión con el factor de Von Willebrand (FvW) propiciando la adhesión de la plaqueta al subendotelio.

Glicoproteínas de Superficie plaquetaria. Las plaquetas cuentan con diversos complejos glicoproteicos en su superficie, involucrados en el

reconocimiento de moléculas involucradas en las diversas funciones plaquetarias. El complejo Gp IbVIX inicia el proceso de adhesión plaquetaria al unirse al FvW y al Colágeno. El complejo Gp IIb-IIIa se une al fibrinógeno, Factor von Willebrand y ADP, provocando cambio de forma, agregación y secreción plaquetaria; así mismo por intermedio del ADP participan otros agentes agregantes como adrenalina, serotonina, etc. La Gp V sirve como receptor para la trombina, otro poderoso agente agregante plaquetario. La Gp Ia constituye el receptor para la colágena que también es un agonista plaquetario. La Gp IV es un receptor de la trombospondina y también para el colágeno tipo I. así mismo recientemente se han identificado otros receptores para el tromboxano A2, para la trombina (R1 y R2 de alta y baja afinidad respectivamente), que participan también como agregantes plaquetarios. Se han identificado otros receptores específicos de adhesión que se les denominan integrinas que sirven también como receptores para las proteínas adhesivas tales como fibronectina, laminina, vitronectina, trombospondina y colágeno.

Por otra parte es rica en glucosiltransferasa, una ectoenzima que reacciona con el grupo amino de la colágena transfiriendo residuos aminoazucares, reacción que resulta importante para iniciar los fenómenos de adhesión y agregación plaquetaria.

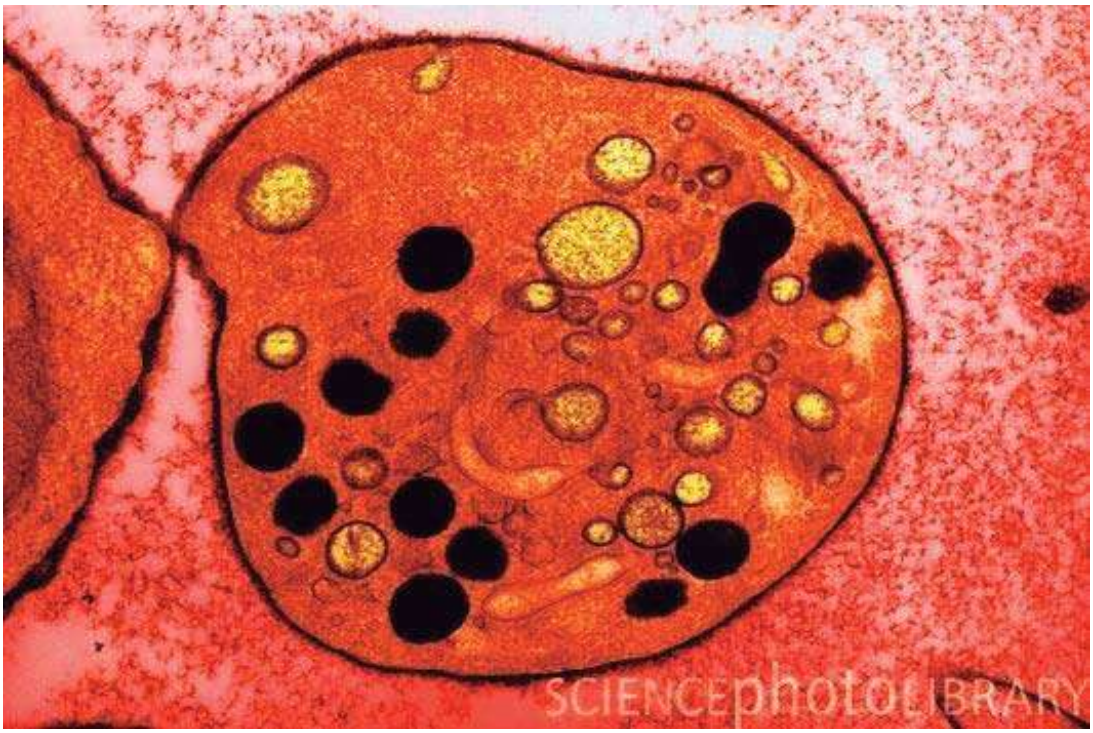
Cuando la plaqueta es activada, se promueve la desestabilización del citoesqueleto de membrana y esto incrementa la movilidad y favorece la capacidad de las plaquetas de extenderse sobre el subendotelio u otro tipo de superficie extraña.

Gránulos. Varios tipos de gránulos se observan en el citoplasma plaquetario: las mitocondrias, que capacitan a estas estructuras en la oxidación de ácidos grasos proveyéndolas de metabolismo aeróbico; ribosomas, en los que gracias a la presencia de RNAm la plaqueta es capaz de llevar a cabo moderada síntesis de proteínas; los gránulos densos que son reservorios de serotonina,

nucleótidos adenilicos metabólicamente no utilizables por la plaqueta e iones calcio y los gránulos alfa con halos periféricos de baja densidad; estos son heterogéneos y algunos contienen enzimas lisosómicas mientras otros son ricos en beta-trombo globulina, factor plaquetario 4 (FP-4), fibrinógeno, factor de Von Willebrand, trombospondina, factor mitogénico y otras proteínas de la coagulación. La ausencia de estos gránulos provoca el síndrome conocido como síndrome de la plaqueta gris.

El Sistema Tubular Denso. Este sistema funciona como un reservorio de calcio que es liberado al citoplasma por diferentes estímulos como el inositol trifosfatado y el tromboxano A2, tras la estimulación de fosfolipasa.

Figura 1. Morfología plaquetaria (oganelos plaquetarios)



Modificaciones Plaquetarias

Durante el proceso de activación plaquetaria, ocurren cambios anatómicos específicos que ocasionan cambio de forma plaquetaria, al pasar de la forma discoide a una forma más redondeada con formación de seudópodos delgados, lo

cual incrementa considerablemente la superficie de contacto con otras plaquetas. Además, las organelos intraplaquetarios comienzan a centralizarse, gracias a la contracción de microtúbulos y microfilamentos. Posteriormente los gránulos fusionan sus membranas con el SCA y liberan su contenido hacia el exterior, potencializando los fenómenos de adhesión, agregación y secreción plaquetaria al activar a otras plaquetas.

Las plaquetas desempeñan un papel clave en la aparición de las complicaciones tromboticas en pacientes con síndromes coronarios agudos (SCA) o en los tratados con intervenciones coronarias percutáneas (ICP). Esto ha establecido el uso generalizado de agentes antiplaquetarios, como el Acido Acetilsalicilico, las tienopiridinas (ticlopidina y Clopidogrel) y los antagonistas de los receptores de la glicoproteína IIb/IIIa, en la prevención de las enfermedades isquémicas coronarias. Sin embargo en los últimos años se han acumulado datos que indican que un número considerable de pacientes continua presentando complicaciones tromboticas a pesar de cumplir el tratamiento antiagregante plaquetario combinado de Ácido Acetilsalicilico y Clopidogrel.

Este fenómeno se ha atribuido en parte a una inhibición insuficiente de una o ambas dianas de los antiagregantes plaquetarios orales, la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1) en el caso del Ácido Acetilsalicilico y el receptor $P2Y_{12}$ del ADP en el caso del Clopidogrel, y que se ha denominado “resistencia” a los fármacos antiagregantes plaquetarios.

3.2 PRINCIPALES AGENTES ANTIPLAQUETARIOS

CLOPIDOGREL

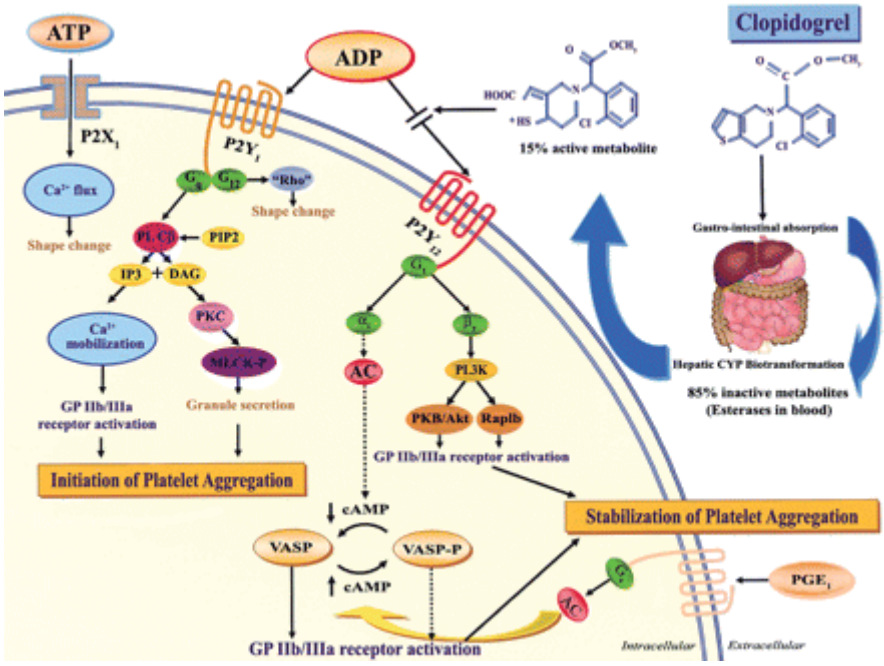
El Clopidogrel es un agente antiagregante plaquetario oral con una estructura y un mecanismo de acción parecidos a los de la ticlopidina. El Clopidogrel se caracteriza por una menor incidencia de reacciones secundarias que la ticlopidina, en particular a nivel cutáneo, gastrointestinal o dermatológico. El Clopidogrel se utiliza para prevenir episodios arterioscleróticos (infarto de miocardio, ictus, y muerte vascular) en pacientes con historia reciente de accidente cerebrovascular, cardio o perivascular.

Pertenece a la familia de las tienopiridinas y son prodrogas que necesitan ser activadas en el hígado por oxidación catalizada por la enzima citocromo P450, para dar origen a sus metabolitos activos.

MECANISMO DE ACCION

El Clopidogrel no tiene actividad antiplaquetaria in vitro. Después de la ingestión oral es metabolizado en el hígado por el citocromo P450 y convertido en 2-oxo-clopidogrel, el cual experimenta hidrólisis antes de unirse e inhibir irreversiblemente el receptor P2Y12 (Fig 1). El metabolito activo inhibe selectiva- e irreversiblemente la agregación plaquetaria inducida por el ADP, impidiendo la unión de la adenosina difosfato al receptor plaquetario. De esta manera la activación del complejo glicoproteico Gp IIb/IIIa resulta alterada. Como este complejo es el receptor más importante para el fibrinógeno, su inactivación impide la unión del fibrinógeno a las plaquetas, lo que finalmente inhibe la agregación plaquetaria. Dado que el metabolito activo del Clopidogrel modifica de forma irreversible el receptor plaquetario, las plaquetas expuestas al fármaco permanecen alteradas el resto de su vida. El metabolito activo del Clopidogrel también inhibe la agregación plaquetaria inducida por otros agonistas. Sin embargo, no inhibe la fosfodiesterasa.

Figura 2. Mecanismo de acción de Clopidogrel.



FARMACOCINETICA

El Clopidogrel se administra por vía oral. In vitro es inactivo y necesita una biotransformación que se realiza en el hígado para adquirir su activación. Se cree que esta activación se lleva a cabo por el sistema de isoenzimas perteneciente a la subfamilia CYP 1A del citocromo P450. El compuesto activo es muy lábil y no ha podido ser identificado, por lo que el perfil farmacocinético corresponde al de un metabolito primario inactivo, un ácido carboxílico que supone aproximadamente el 85% de los metabolitos circulantes en el plasma.

La absorción del clopidogrel es del 50% y no es afectada significativamente por los alimentos. Las concentraciones plasmáticas máximas del metabolito primario se consiguen 1 hora después de la dosis de 75 mg. Dos horas después de una dosis oral, ya no son detectables concentraciones plasmáticas del fármaco sin alterar. El

clopidogrel y su principal metabolito se unen de forma reversible a las proteínas plasmáticas (98 y 94% respectivamente). Aproximadamente el 50% del clopidogrel de marcado radioactivamente se elimina en la orina mientras que el 46% lo hace en las heces a lo largo de un período de cinco días; la semi-vida plasmática es de aproximadamente 8 horas. Dos horas después de una única dosis oral, ya se observa una inhibición de la agregación plaquetaria. Con dosis repetidas de 75 mg por día, el máximo de inhibición de la agregación plaquetaria se consigue a los 3-7 días. En condiciones de equilibrio, la agregación plaquetaria es inhibida en un 40-60%. La prolongación del tiempo de hemorragia no es afectada de forma significativa por la edad, la disfunción renal o el género. La agregación plaquetaria y el tiempo de hemorragia vuelven gradualmente a su nivel basal unos cinco días después de la discontinuación del tratamiento.

ASPIRINA

La aspirina, el ester salicílico del ácido acético fue introducida en la clínica en 1899 siendo utilizada como analgésico, anti-inflamatorio, antipirético y antitrombótico. Una vez en el organismo, el ácido acetilsalicíco es hidrolizado a salicilato que también es activo

Mecanismo de acción

El ácido acetilsalicílico interfiere con la síntesis de las prostaglandinas inhibiendo de forma irreversible la ciclooxigenasa, una de los dos enzimas que actúan sobre el ácido araquidónico. La ciclooxigenasa existe en forma de dos isoenzimas: la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Estas isoenzimas están codificadas por genes diferentes, presentes en lugares diferentes (la COX-1 está presente sobre todo en el retículo endoplásmico, mientras que la COX-2 se encuentra en la membrana nuclear) y tienen funciones diferentes. La COX-1 se expresa en casi todos los tejidos y es responsable de la síntesis de prostaglandinas en respuesta a estímulos hormonales, para mantener

la función renal normal, así como la integridad de la mucosa gástrica y para la hemostasis. La COX-2 se expresa sólo en el cerebro, los riñones, los órganos reproductores y algunos tumores. Sin embargo, la COX-2 es inducible en muchas células como respuesta a algunos mediadores de la inflamación como son la interleukina-1, el TNF, los mitógenos, lipopolisácaridos y radicales libres.

Se ha observado un aumento de la expresión de la COX-2 en adenomas colorectables así como en otros cánceres.

La aspirina acetila la serina en ambas COX y como casi todos los tejidos producen eicosanoides, los efectos del fármaco son muy diversos:

Efectos antitrombóticos: La COX-1 de las plaquetas genera el tromboxano A2, un potente vasoconstrictor y agonista de las plaquetas. Los efectos de la aspirina sobre la agregación plaquetaria tienen lugar con dosis mucho menores que las requeridas para un efecto analgésico o anti-inflamatorio. La COX-1 de las plaquetas es más sensible que la COX-1 del endotelio, lo que explica la necesidad de dosis muy bajas de aspirina para conseguir un efecto antitrombótico, lo que es deseable en pacientes con enfermedad coronaria. La inhibición de la COX-1 plaquetaria ocasiona una disminución de la agregación plaquetaria con un aumento del tiempo de sangrado. Estos efectos sobre la hemostasia desaparecen a las 36 horas de la administración de la última dosis. Aunque el ácido acetilsalicílico no actúa sobre la agregación plaquetaria inducida por la trombina (que se produce cuando se activan las plaquetas como consecuencia de la ruptura de una placa de ateroma al inicio de un episodio de angina inestable), se recomienda su administración en pacientes con historia de enfermedad coronaria y de angina estable. Se cree que los efectos beneficiosos de la aspirina en la profilaxis del infarto de miocardio se deben a su capacidad para reducir los niveles de proteína C reactiva. Con dosis muy altas, la aspirina también ejerce un efecto inhibitorio sobre la hemostasis dependiente de la vitamina K, con lo que se altera la síntesis de protrombina resultando una hipoprotrombinemia.

Efectos anti-inflamatorios: Se cree que la actividad anti-inflamatoria del

ácido acetil-salicílico se debe a la inhibición periférica de la acción de la COX-1 y de la COX-2, aunque la aspirina puede también inhibir la síntesis de otros mediadores de la inflamación. Sin embargo, se cree que la respuesta inflamatoria más importante está mediatizada por la COX-2 ya que esta enzima es inducible por las citocinas. La inhibición de la COX-2 por la aspirina reduce la síntesis de las prostaglandinas E y F, prostaglandinas que responsables de la vasodilatación y la permeabilidad capilar lo que, a su vez, aumenta la movilidad de fluidos y leucocitos que son los ocasionables de la inflamación, enrojecimiento y dolor. El ácido acetil-salicílico no solo disminuye la permeabilidad capilar sino que también reduce la liberación de enzimas destructoras de los lisosomas.

.**Efectos analgésicos**: los efectos analgésicos de la aspirina son, al parecer, efectos indirectos sobre el sistema nervioso central. Al disminuir la síntesis de prostaglandinas, la aspirina reduce la percepción del dolor.

.**Efectos antipiréticos**: son el resultado de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en el hipotálamo, lo que a su vez induce una vasodilatación periférica y sudoración.

.**Efectos antiproliferativos:** Aún cuando el ácido acetilsalicílico acetila la COX-2, esta enzima acetilada retiene algo de su capacidad para metabolizar el ácido araquidónico para producir al ácido graso 15R-hydroxieicosatetraenoic (15R-HETE). Se sabe que los hidroxiácidos tienen efectos antiproliferativos. No se sabe con exactitud si los efectos de la aspirina reduciendo los niveles de prostaglandinas contribuyen a su actividad antitumoral.

.**Efectos renales**: Los salicilatos actúan sobre los túbulos renales afectando la resorción del ácido úrico. En dosis bajas, de 1-2 g/día, los salicilatos inhiben la secreción activa de ácido úrico en la orina a través de los túbulos proximales. En dosis más altas ((> 5 g/días), los salicilatos inhiben la reabsorción tubular de ácido úrico, lo que ocasiona un efecto uricosúrico. A dosis intermedias, la aspirina no modifica la eliminación del ácido úrico

.**Otros efectos:** En el tratamiento de la conjuntivitis primaveral, la aspirina

previene la formación de prostaglandina D2, un mediador secundario de los mastocitos y de las condiciones alérgicas.

PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

El ácido acetilsalicílico se administra usualmente por vía oral, aunque puede ser administrado por vía rectal en forma de supositorios. Se absorbe rápidamente por el tracto digestivo si bien las concentraciones intragástricas y el pH del jugo gástrico afectan su absorción. La aspirina es hidrolizada parcialmente a ácido salicílico durante el primer paso a través del hígado y se distribuye ampliamente por todos los tejidos del organismo.

La aspirina se une poco a las proteínas del plasma, pero debe ser administrada con precaución a pacientes tratados con fármacos que se fijan fuertemente a las proteínas del plasma, como es el caso de los anticoagulantes y antidiabéticos orales.

Después de la administración oral y dependiendo de las dosis administradas se observan salicilatos en plasma a los 5-30 minutos y las concentraciones máximas se obtienen a los 0.25-2 horas. Las concentraciones plasmáticas deben de ser de por lo menos 100 µg/ml para obtener un efecto analgésico y se observan efectos tóxicos con concentraciones superiores a 400 µg/ml. La aspirina se metaboliza en un 99% a salicilato y otros metabolitos. La semi-vida de eliminación del plasma es de 15 a 20 minutos. Los salicilatos, pero no la aspirina, experimentan una cinética de Michaelis-Menten (saturable). En dosis bajas, la eliminación es de primer orden y la semi-vida permanece constante con un valor de 2-3 horas; sin embargo, con dosis más altas, las enzima responsables del metabolismo se saturan y la semi-vida de eliminación puede aumentar a 15-30 horas. Por esta razón, se requieren entre 5 y 7 días para alcanzarse unas condiciones de equilibrio ("Steady state")

Los salicilatos y sus metabolitos se eliminan principalmente por vía renal, siendo excretada por la orina la mayor parte de la dosis. Aproximadamente el 75% de la dosis se encuentra en forma de ácido salicilúrico, mientras que el 15% está en forma de conjugados, sobre todo mono- y diglucurónidos. El 10% restante está constituido por salicilato libre. La alcalinización de la orina aumenta la eliminación

de salicilato, pero no la de otros metabolitos.

TERAPIA DUAL

Estos dos agentes, AAS y Clopidogrel, de un modo independiente son inhibidores débiles y desarrollan su actividad inhibitoria a través de mecanismos independientes. La administración conjunta (terapia dual) consigue una mayor inhibición de la activación plaquetaria. Diversos estudios clínicos han demostrado la efectividad de esta combinación en la prevención de la trombosis del stent después de una Intervención Coronaria Percutánea (Steinhubl, *JAMA* 2002. Metha, *Lancet* 2001), reduciendo la incidencia de eventos adversos cardio-cerebro-vasculares mayores en pacientes con Síndromes Coronarios Agudos, por lo que es la terapia usada con mayor frecuencia. (Yusuf, *N Eng J Med 2002)* e IAMEST (Sabatine, *N Eng J Med* 2005, Chen *Lancet* 2005).

Las plaquetas desempeñan un papel clave en la aparición de las complicaciones tromboticas en pacientes con síndromes coronarios agudos (SCA) o en los tratados con intervenciones coronarias percutáneas (ICP). En consecuencia, el cumplimiento del tratamiento antiagregante plaquetario, en especial el de los antiagregantes plaquetarios orales acido acetilsalicilico y Clopidogrel, constituye una medida de prevención secundaria fundamental en esos pacientes.

RESISTENCIA A FARMACOS ANTIPLAQUETARIOS

La respuesta de los pacientes al AAS y clopidogrel tiene una distribución normal. Por tanto, la terapia antiplaquetaria no puede considerarse de una forma dicotómica (respuesta SI/NO) , sino como una variable continua. De acuerdo a la curva de distribución normal sería esperable encontrar ≈5% de hiper e hipo-respondedores, como ocurriría con otras drogas. La respuesta variable inter-individuos al AAS y Clopidogrel es multifactorial y los mecanismos no se han dilucidado completamente. Estos mecanismos pueden dividirse en factores farmacocinéticos (falla para alcanzar/mantener niveles adecuados de la droga activa) o farmacodinámicos (a pesar de niveles adecuados existe una falla en la

inhibición de receptores específicos); además del entorno clínico, diversos factores pueden afectar la respuesta al tratamiento antiplaquetario, entre estos destacan los factores celulares (supresión insuficiente de COX-1, sobre-expresión de RNAm de COX-2,interacción de plaquetas con otras células, aumento de norepinefrina) y los factores genéticos (polimorfismos del Receptor P2Y12 : Alelo H2, del Citocromo P450 3A4 (CYP3A4), de glicoproteínas de la membrana plaquetaria, del factor de von Willebrand, del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa o del receptor de colágeno). Otro factor que puede afectar la respuesta a la terapia antiplaquetaria es la posibilidad de una interacción droga-droga (los pacientes cardiópatas reciben múltiples drogas en su tratamiento). Por ejemplo, se ha demostrado inhibición del Clopidogrel con los inhibidores de la bomba de protones (Omeprazol) (Gilard M, *J Am Coll Cardiol* 2008). Todo lo anterior evidencia la necesidad de monitorear la actividad plaquetaria durante el tratamiento con agentes antiplaquetarios. Desde el punto de vista bioquímico, la resistencia al tratamiento se basa en la falla para alcanzar estándares inhibitorios "adecuados" en pruebas de laboratorio que evalúan la función plaquetaria.

Monitoreo de la Terapia antiplaquetaria por el Laboratorio.

Los agentes antitrombóticos son empleados en una gran variedad de situaciones clínicas como las enfermedades cardiovasculares y angioplastias; la citometría de flujo ha demostrado ser un método eficaz en el seguimiento de pacientes con este tipo de terapia. Algunos autores han reportado que el uso de agentes antiplaquetarios reducen la incidencia de eventos cardiovasculares isquémicos. Otros estudios han encontrado marcadores bioquímicos de activación plaquetaria elevados durante los episodios de isquemia cardíaca aguda, lo cual pudiera ayudar a identificar pacientes que puedan ser beneficiados con una terapia antiplaquetaria adicional. El efecto de los fármacos ticlopidina y Clopidrogel pueden ser evaluados mediante la citometría de flujo. Existen otros compuestos cuya acción está dirigida contra la integrina GPIIb/IIIa, de forma tal que bloquean su enlace al fibrinógeno e impiden la formación de agregados plaquetarios. Entre ellos se encuentra el abciximab y el fragmento quimérico c7E3Fab, cuyos efectos

pueden evaluarse por este método.

3.3 INDICE DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA

Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP)

Es una proteína que en los humanos es codificada por el gen de la VASP. La fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) es un miembro de la familia de proteínas Ena-VASP. En la región media de la proteína, los miembros de la familia tienen un dominio rico en prolina que se une dominio SH3 y WW-proteínas que contienen. Su dominio C-terminal media EVH2 tetramerización y se une tanto a la actina G y F. VASP está asociada con la formación de filamentos de actina y probablemente juega un papel muy extendida en la adhesión celular y la motilidad.

VASP también pueden estar implicados en las vías de señalización intracelular que regulan la interacción de la integrina-matriz extracelular. VASP está regulado por los nucleótidos cíclicos quinasas dependientes de PKA y PKG.

Es una prolina-rico sustrato de proteína camp y de GMPc-dependiente de proteínas quinasas

La fosforilación de VASP en ser-157causa un cambio de la movilidad en la electroforesis de SDS de 46 a 50 kDa.

FOSFORILACION DEL VASP INTRAPLAQUETARIO

La fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) es una fosfoproteína intracelular que no está fosforilada en condiciones basales. La fosforilación de la fosfoproteína VASP se asocia a la inhibición del receptor $P2y_{12}$ mientras que la forma de VASP no fosforilado se asocia al estado activo de este.

El VASP se encuentra acoplado a proteínas G y estas a su vez al adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y fosfatidil inositol 3-cinasa. La prostaglandina E1 es un activador de la fosforilación del VASP, a través de la activación del AMPc

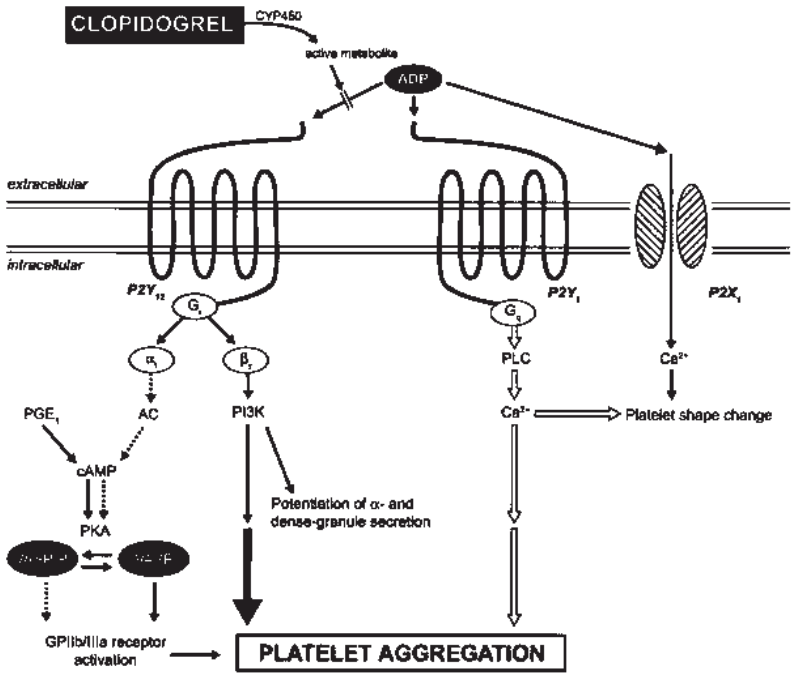
dependiente de protein cinasas

Por tanto los niveles de fosforilación y desfosforilación del VASP reflejan la inhibición/activación del receptor $P2y_{12}$. (Fig 2)

La fosforilación de VASP, asociada a la inhibición del receptor $P2y_{12}$ puede ser medida fácilmente mediante Citometria de Flujo, el cual ha sido usado ex vivo para probar la eficacia del Clopidogrel en pacientes con enfermedad cardiovascular isquémica.

A partir de la técnica de fosforilación de VASP por citometria de flujo, podremos obtener un índice de reactividad plaquetaria (IRP) porcentual, el cual permitirá ubicar a un individuo de acuerdo a una escala de 1-100% en un buen respondedor o mal respondedor al tratamiento antiplaquetario con Clopidogrel.

Figura 3. Fosforilación de VASP e inhibición plaquetaria inducida por Clopidogrel.



3.4 LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ESTUDIO DE LAS PLAQUETAS

Los ensayos de citometría de flujo complementan e incluso pueden remplazar los estudios convencionales de función plaquetaria.

El valor diagnóstico del método ha sido bien establecido en el estudio de defectos genéticos, de los síndromes protrombóticos que involucran activación plaquetaria, trombopoyesis, terapia antitrombótica, estudios de trombocitopenias alo y autoinmunes, así como la activación plaquetaria en otras situaciones clínicas como el infarto agudo de miocardio y la angina inestable. La incorporación de la citometría de flujo al estudio de las plaquetas ha tenido una importante repercusión no solo en el diagnóstico, sino también en la fisiopatología de un grupo de enfermedades relacionadas con el comportamiento plaquetario.

El citómetro de flujo. Principio de funcionamiento

En este equipo coinciden tecnologías de vanguardia tales como la mecánica de fluidos, el láser, la óptica, la electrónica y la informática, que lo convierten en un equipo único tanto desde el punto de vista técnico como funcional.

A las células que serán examinadas se les acopla un fluorocromo generalmente a través de un anticuerpo monoclonal que reconoce una estructura específica en la célula. Posteriormente, las células son suspendidas en el centro de un flujo de líquido isotónico que es impulsado a gran velocidad por un orificio estrecho y deben pasar a través de una fuente luminosa (láser) de forma secuencial. El láser, al incidir con cada célula, se desvía y este cambio de dirección es registrado por detectores especiales.

Ventajas y limitaciones de la citometría de flujo

La aplicación de la citometría de flujo en el estudio de las plaquetas ofrece grandes ventajas sobre otros métodos de análisis, porque es el único hasta el momento que puede medir la extensión de la activación de plaquetas individuales

y detectar subpoblaciones de plaquetas.

Las plaquetas pueden ser analizadas en su medio fisiológico incluyendo eritrocitos y leucocitos, los cuales afectan la activación plaquetaria. La manipulación mínima de las muestras evita interferencias por activación in vitro y reduce las posibles pérdidas de subpoblaciones de plaquetas. Por otra parte, es posible determinar el estado de activación de las plaquetas circulantes y las modificaciones específicas que ocurren en la superficie celular como consecuencia de este proceso. Además pueden ser detectados hasta el 1% del total de plaquetas en la muestra de sangre y se necesitan pequeñas alícuotas de sangre (aproximadamente 2 µL) para evaluarlas.

. Este método solamente mide la función de las plaquetas que circulan, sin embargo, si las plaquetas activadas son eliminadas rápidamente o están adheridas a las paredes de los vasos sanguíneos o a los circuitos extracorporales, puede no existir evidencias de activación plaquetaria. Además, las muestras de sangre deben ser procesadas en un intervalo de 45 minutos después de la extracción para evitar una posible activación ex vivo.

Ventajas y Limitaciones del método:

La activación plaquetaria puede ser estudiada en sangre total.

Mínima manipulación de las muestras -Las muestras deben ser procesadas después de la extracción en no más de 45 minutos

Determinación de estado de activación y reactividad de plaquetas circulantes

Elevada sensibilidad para la detección de subpoblaciones de plaquetas -Su aplicación tiene limitaciones a determinadas situaciones clínicas

Se requieren mínimas cantidades de muestras

No se emplean sustancias radioactivas

Áreas de aplicación de la técnica

El área de aplicación de esta técnica en el análisis de plaquetas consiste en la caracterización de enfermedades relacionadas con anomalías celulares, el diagnóstico de enfermedades relacionadas con disfunción plaquetaria, el control de agentes terapéuticos dirigidos a las plaquetas, conteo celular y su volumen. Estas 4 vertientes están basadas en tipos de ensayos diferentes que se agrupan en reactividad plaquetaria, función hemostática, grado de maduración y reacción de anticuerpos dirigidos contra plaquetas.

Marcadores de activación plaquetaria

La molécula de P-selectina es una proteína que se encuentra en la membrana de los gránulos a (alfa) en las plaquetas en reposo. Cuando es desencadenado el complejo proceso de activación, los gránulos a (alfa) liberan su contenido y su membrana se fusiona con la membrana celular; de esta forma, esta molécula llega a convertirse en una proteína que forma parte de la cara externa de la membrana celular. La cuantificación de P-selectina se ha convertido en el indicador de activación plaquetaria más ampliamente difundido que se emplea por técnicas de citometría de flujo, y algunos autores lo utilizan exclusivamente para medir esta función a través del anticuerpo monoclonal antiCD62P.

Tabla 1. Antígenos plaquetarios cuantificables por citometría de flujo

Anticuerpo monoclonal	Estructura antigénica	Función
CD62P	P selectina	Activación plaquetaria
CD41	GPIIb	Agregación
CD61	GPIIIa	
PAC-1	GPIIb/IIIa de alta afinidad	Ambas estructuras conforman el receptor para el fibrinógeno
CD42a	GPIX	Adhesión
CD42b	GPIb□	
CD42c	GPIb□	Todas estas subunidades conforman el receptor del factor von Willebrand
CD42d	GPV	
CD36	GPIV	Receptor para la trombospondina y el colágeno
CD63	GP53	Proteína lisosomal
CD51	RVN□	Cadena a del receptor de vitronectina

Se han utilizado otros marcadores en el estudio de la función hemostática de las plaquetas como la determinación de micropartículas (que son vesículas que se derivan de la membrana plasmática de estas células) que expresan glicoproteínas en su superficie como resultado del proceso de activación celular. El método de citometría de flujo es el más empleado para cuantificar el porcentaje de micropartículas y es considerado por algunos autores un método útil para la detección de actividad plaquetaria in vivo.

Valor diagnóstico del método

La citometría de flujo como método diagnóstico tiene una amplia aplicación en las disfunciones plaquetarias primarias o secundarias, debido a su gran especificidad y sensibilidad.

Este valor diagnóstico ha sido bien establecido en los defectos genéticos, síndromes protrombóticos que involucran activación plaquetaria, trombopoyesis, terapia antitrombótica, estudios de trombocitopenias alo y autoinmunes y activación plaquetaria en otras situaciones clínicas.

Estudios de activación plaquetaria en otras situaciones clínicas

Los estudios de citometría de flujo en sangre total han demostrado la existencia de plaquetas activadas circulantes en la angina inestable y en el infarto agudo del miocardio. También se ha demostrado que existe un aumento de la reactividad plaquetaria en pacientes con enfermedad coronaria estable y en la angioplastia coronaria, incluso, se ha reportado que el análisis de los marcadores de activación plaquetaria por citometría de flujo antes de la angioplastia puede ayudar a predecir si existe un incremento en el riesgo de eventos isquémicos después de este proceder.

Recientemente fue publicado por Nakamura y colaboradores el empleo del porcentaje de plaquetas reticuladas para evaluar la cinética plaquetaria en diferentes categorías clínicas de isquemias cerebrales, y se observó que el porcentaje de plaquetas reticuladas fue significativamente mayor en las isquemias cardioembólicas que en individuos sanos.

Sin embargo, en un estudio comparativo en pacientes con insuficiencia cardíaca se encontró que el grado de activación de las plaquetas no tenía relación con la presencia de isquemia en los pacientes estudiados y no se observó relación con la severidad clínica de la enfermedad.

Se puede concluir que la incorporación de la citometría de flujo al estudio de las plaquetas ha permitido la profundización en el conocimiento de estas células y en particular de su función, lo que ha tenido una importante repercusión no solo en el diagnóstico, sino también en la fisiopatología de un grupo de enfermedades relacionadas con el comportamiento plaquetario.

4. JUSTIFICACION

Existe una población de pacientes con enfermedad arterial coronaria que presenta baja respuesta al tratamiento con Clopidogrel, lo cual se ha asociado con eventos cardio.cerebro vasculares mayores (ECCVM) en lapsos cortos de tiempo que comprometen la vida del paciente, provocado por un estado de activación plaquetaria que conllevan a una trombosis. Este problema ha llegado a ser tan importante que se ha acuñado el termino “resistencia” al Clopidogrel.

5. HIPOTESIS

Existe una inhibición de la actividad plaquetaria al tratamiento con clopidogrel en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a cateterismo cardiaco.

6. OBJETIVOS

Evaluar la actividad plaquetaria al tratamiento con clopidogrel, en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a cateterismo caridaco a partir de la técnica de fosforilacion de VASP por citometria de flujo.

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el índice de reactividad plaquetaria en pacientes sometidos a angioplastia coronaria que llevan tratamiento con clopidogrel

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Evaluar el efecto antiplaquetario del clopidogrel mediante la persistencia de VASp fosoforilado inducido por PGE1 (prostaglandina E1) a pesar de la adición de ADP y evaluar el índice de reactividad plaquetaria (IRP), basal, a las 24 horas al inicio del tratamiento con dosis de carga de 600mg de Clopidogrel.

7. MATERIAL Y METODOS.

7.1 SITIO DE ESTUDIO

Unidad de Hemodinamia del Hospital General “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia y Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina “Dr. Ignacio Chávez de la UMSNH.

CRITERIOS

CRITERIOS DE INCLUSION

Pacientes con Angiografía que fueran sometidos o no a intervención coronaria percutánea (ICP), y que reciban una dosis de carga de 600 mg de Clopidogrel 6 - 10 horas previas.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Pacientes con infarto agudo miocárdico con elevación del segmento ST

Pacientes que fueran sometidos a tratamiento con anticoagulantes orales o antidepresivos.

Pacientes que no aceptaron participar en el proyecto mediante la firma de carta de consentimiento informado

Pacientes sometidos a tratamiento con omeprazol

Pacientes con alteraciones hepáticas

CRITERIOS DE ELIMINACION

Pacientes que decidieron retirarse del estudio

Pacientes cuyas muestras biológicas no fueron procesadas/almacenadas en las condiciones idóneas y por lo tanto no aseguraron su calidad biológica

Pacientes cuyas muestras sanguíneas resultaron lipémicas o hemolizadas.

TOMA DE MUESTRAS

Las muestras se obtuvieron de pacientes con cardiopatía isquémica antes de la realización del intervencionismo coronario (toma basal) por punción femoral o radial, desechando los primeros 5 ml para desechar las plaquetas que sufrieron activación plaquetaria por el hecho de la punción, y otra toma de muestra en la visita de seguimiento a las 24hrs la cual se obtuvo por punción venosa en el antebrazo; estas muestras fueron recolectadas en tubos al vacío (sistema vacutainer) con anticoagulante citrato sódico al 3.2% en relación 1:9.

Las muestras se procesaron en sangre total (con minima manipulación para prevenir la activación plaquetaria) en un lapso de tiempo no mayor a una hora.

7.2 MATERIAL

Tubos con citrato de Na

Pipetas automáticas de volumen variable, de 100 microlitos, 1000 microlitos, puntas desechables.

Reactivo PBS con EDTA al 0.009% pH de 7.4

Solucion de lisis

Cámara húmeda

Citómetro

Kit estandarizado de citometria de flujo

PROCEDIMIENTO VASP/P2Y12

RECEPCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

• Recogida de la muestra:

- Se utilizaron tubos de extracción de plástico hidrófobo (BD Vacutainer, NJ USA).

- Las plaquetas deben conservar totalmente su integridad, es importante evitar cualquier riesgo de activación durante la extracción (agitación, shock térmico).

- Anticoagulante: citrato sódico 0,109 M (3.2%) (1 volumen de citrato por 9 volúmenes de sangre, relación 1:9)

• Tratamiento de la muestra:

- La muestra fue procesada dentro de las 48 horas siguientes a la extracción, con el objeto de preservar la integridad y reactividad de las plaquetas.
- El tubo con la sangre debe estar lleno (4 ml), conservarse a temperatura ambiente (18 -25° C) y no debe abrirse antes del análisis, para asegurar la esterilidad de la muestra.
- La prueba se realiza en sangre total con citrato como anticoagulante, esto para evitar la activación que pudieran sufrir las plaquetas con la centrifugación y separación de plasma rico en plaquetas. Lo anterior demuestra una ventaja sobre otros métodos de estudio, en los cuales es necesaria la centrifugación y separación de las plaquetas.

PROCEDIMIENTO

Todos los reactivos, como el volumen utilizado es mínimo (10 □l), fueron dispensados en el fondo de los tubos. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente al llevar a cabo el protocolo.

7.3 METODOLOGIA

TECNICA DE FOSFORILACION DEL VASP POR CITOMETRIA DE FLUJO. Para la evaluación del estado de fosoforilación del VASP, se utilizó como muestra la sangre total y un kit estandarizado de citometría de flujo para análisis de plaquetas. La muestra recolectada previamente en un tubo con citrato de sodio para la obtención de sangre total fu incubada en un primer tubo de polipropileno con prostaglandina E1 (PGE1) y en un segundo y tercer tubo con PGE1 y adenosin difosfato de sodio (ADP) por 10 minutos con agitación y fijada con paraformaldehido, posteriormente las plaquetas fueron permeabilizadas con un detergente no iónico. Posteriormente se incorporó el anticuerpo monoclonal primario dirigido contra el VASP, seguido de un anticuerpo secundario anti-VASp conjugado con isotiocianato de fluoresceína, y finalmente el anticuerpo de detección plaquetaria dirigido contra el CD61 marcado con ficoeritrina (anti-CD 61-

PE). La duración total de la preparación no excedió los 30 minutos. El índice de reactividad plaquetaria (IRP) fue calculado a través del índice de fluorescencia media (IMF) de las muestras incubadas con PGE1 y PGE1 + ADP, de acuerdo con la fórmula para la obtención del índice de reactividad plaquetaria:

FORMULA PARA GENERAR EL INDICE DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA (IRP)

El IRP se calcula con el valor obtenido del IMF de PGE1, al restar su valor de IMF generado en el tubo 1(T1) menos el tubo 3 (T3), de la región R2. Este valor (PGE1) se resta a la IMF de PGE1 + ADP que se identifica en la región R2 restando el valor del tubo 2 (T2) al tubo 3 (T3). De esta sustracción, el resultado se divide sobre el IMF de PGE1 y luego multiplicándolo por 100, para generar el porcentaje del IRP. Con la fórmula descrita a continuación, se obtiene el IRP. Valores superiores a 69%, indican poca inhibición de la reactividad plaquetaria. Valores menores a 69%, indican buena inhibición de la reactividad plaquetaria (Siller – Matula J, Lang I, Christ G, et.al. Calcium cannel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. J am Coll Cardio 2008;52:1557-63).

IMF (PGE1) = IMF (T1) – IMF (T3)

IMF (PGE1+ ADP) = IMF (T2) – IMF (T3)

%IRP= IMF (PGE1) – IMF (PGE1+ADP)/ IMF (PGE1) x 100

Tabla 2.**PREPARACIÓN DE LOS TUBOS Y DE LA MUESTRA**

TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
5 µl de **reactivo PGE1**	5 µl de **reactivo PGE1 + ADP**	5 µl de **reactivo PGE1+ ADP**
10 µl de sangre total	10 µl de sangre total	10 µl de sangre total

Homogeneizar durante 1 o 2 segundos en vortex a velocidad lenta.

Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente

FIJACION

Añadir a los tres tubos 5 µl de fijador (formaldehido al 3%)
Homogeneizar en vortex 1 o 2 segundos en vortex a velocidad lenta.
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente

Tabla 3.**PERMEABILIZACION CELULAR E INMUNOMARCAJE**

TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
5 µl de **reactivo Anticuerpo monoclonal anti vasp-p + permeabilizante**	5 µl de **reactivo Anticuerpo monoclonal anti vasp-p + permeabilizante**	5 µl de **reactivo Control isotópico negativo + permeabilizante**

Homogeneizar en vortex
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente

MARCAJE FLUORESCENTE Y DETECCION PLAQUETARIA

Añadir a los tres tubos 5 □l de anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón marcado con FITC.
Homogeneizar en vortex
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente

Añadir a los tres tubos 1 mililitro de diluyente especial para citometría de flujo.

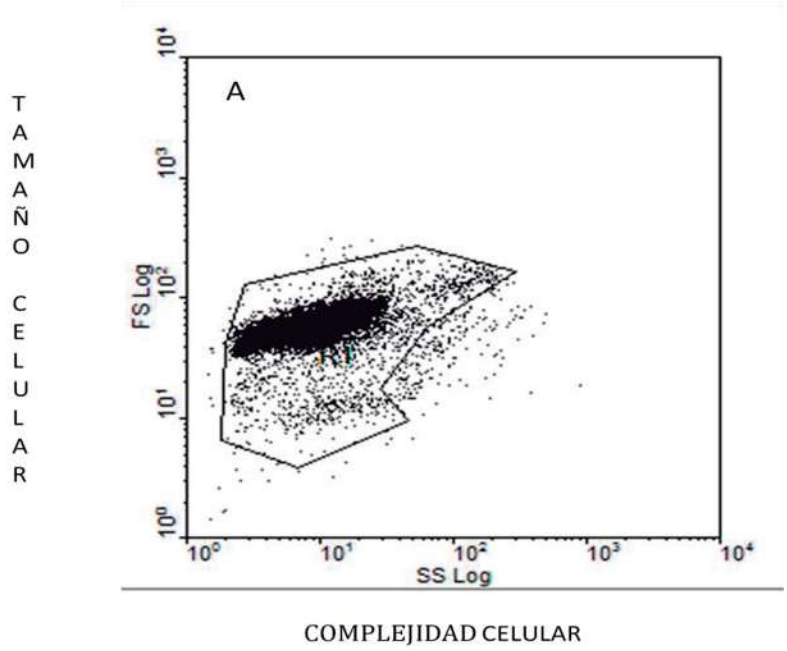
Colocar inmediatamente los tubos a 2-8 °C hasta el momento de la adquisición en el citometro

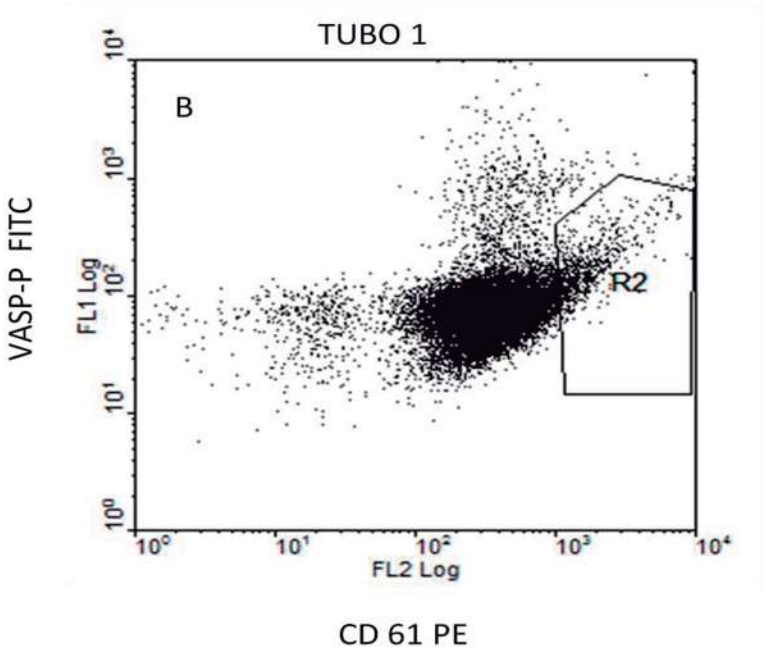
7.4 ANALISIS

ADQUISION DE LAS PLAQUETAS EN EL CITOMETRO DE FLUJO

Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Altra (Beckman Coulter), con el programa Expo 32, previa calibración del equipo con las perlas calibradoras (Flow- Check, cat. No., Beckman-Coulter Inc., Fullerton CA.) que contienen los fluorocromos FITC, PE, ECD, PC5. La adquisión de las plaquetas se realizó de acuerdo a sus características de dispersión de luz frontal (FSC, tamaño) y de luz lateral (SSC, complejidad), considerando estos parámetros en escalas logarítmicas por el tamaño de las plaquetas (1-3 micras). Para esto se adquirió un tubo que solamente contenía plaquetas suspendidas en amortiguados de fosfatos (PBS-EDTA, control celular). Enseguida, se generó la región (R1) en la zona de las plaquetas, en las cuales se determinó posteriormente la expresión de VASP-P/CD61 . Luego, se hizo la región R2 en función de la expresión de VASP-P/CD61, en la tercera década logarítmica; de aquí se tomó el valor de la intensidad media de fluorescencia correspondiente a la expresión de VASP-P, es decir, el parámetro estadístico indicativo de la intensidad de fluorescencia media (IFM) es la media geométrica Mn (Y) (Figura 4 A y B).

Figura 4.Formacion de las regiones para la evaluación de las muestras por medio de la citometria de flujo. Expresión palquetaria tamaño contra complejidad (A). formación de la región R2 a evaluar respecto a la reactividad plaquetaria inhibida por clopidogrel (B).





8. RESULTADOS

Un total de 31 pacientes fueron incluidos en el presente estudio. De los 31 pacientes 9 eran del sexo femenino (F) (29.03%) y 22 del sexo masculino (M) (70.96%). De estos, 19(61.29%) eran diabéticos (DM) , 23 (74.19%) de nuestros pacientes presentaban hipertensión arterial (HAS), con antecedentes de tabaquismo lo presentaron 20 (64.51%), con dislipidemia 23 (74.19%) de los pacientes, y solo 6 (19.35%) tenían antecedentes familiares de afección cardiovascular en la familia.

Tabla 4. Características demográficas de los pacientes

PACIENTES	EDAD	SEXO
1	62	F
2	74	M
3	45	M
4	60	M
5	70	F
6	65	F
7	70	M
8	50	M
9	71	M
10	57	M
11	78	M
12	59	M
13	65	M
14	70	M
15	66	M
16	66	M
17	77	M
18	79	F
19	70	M
20	70	F
21	67	M
22	74	F
23	78	M
24	69	F
25	57	M
26	44	M
27	49	M
28	59	M
29	56	M
30	79	F
31	60	F

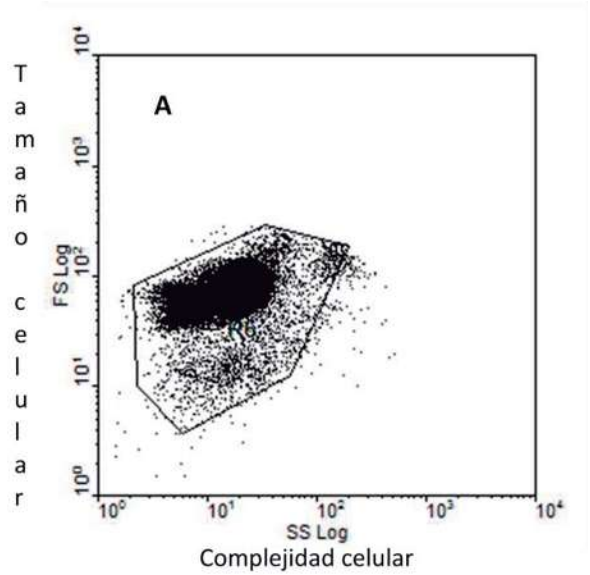
Tabla 5. Antecedentes heredofamiliares patológicos

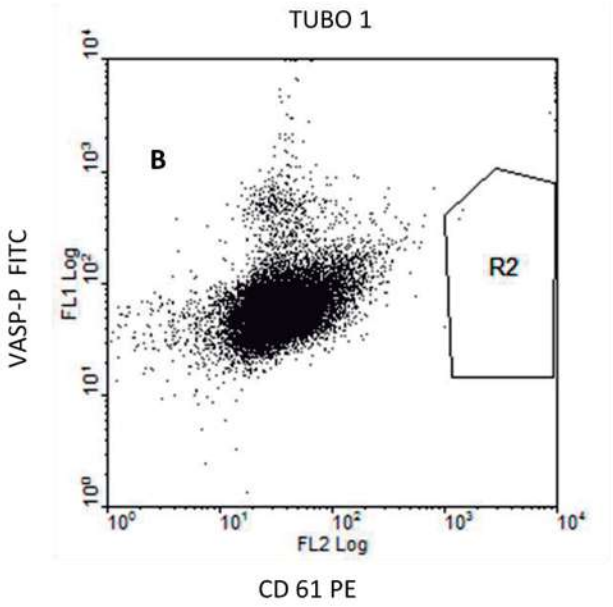
PACIENTES	TABAQUISMO	ANTECEDENTE FAMILIAR	DM	HAS	DISLIPIDEMIA
1	N	N	S	S	N
2	N	N	S	N	N
3	N	N	N	N	N
4	S	N	N	S	S
5	S	N	S	S	N
6	S	N	N	S	N
7	S	N	N	S	S
8	N	S	N	N	S
9	N	N	S	S	N
10	S	N	S	S	S
11	S	N	S	S	S
12	S	S	N	S	S
13	S	S	S	S	S
14	S	N	N	S	S
15	S	S	S	S	S
16	S	N	S	S	S
17	S	N	N	S	S
18	N	N	N	S	S
19	S	S	S	S	S
20	N	N	S	S	S
21	S	N	S	N	S
22	N	N	S	N	S
23	N	N	S	S	S
24	N	N	S	S	S
25	S	N	N	N	S
26	S	S	N	N	N
27	S	N	S	S	N
28	S	N	N	S	S
29	S	N	S	S	S
30	S	N	S	N	S
31	N	N	S	S	S

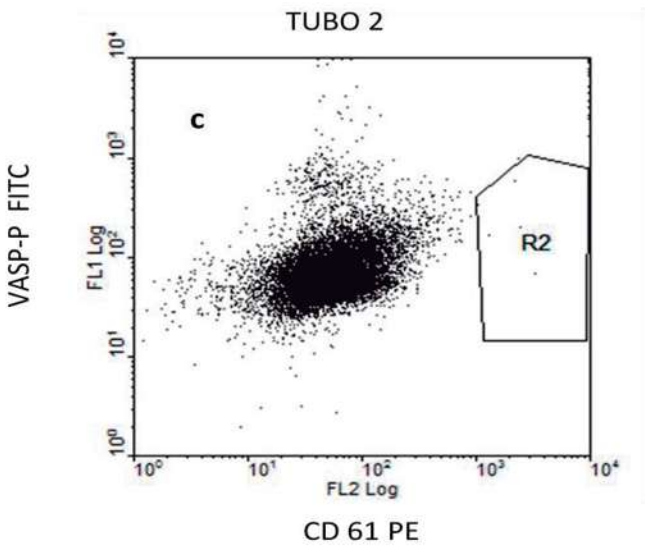
Tabla 6. Índices de reactividad plaquetaria (tomas basal y 24 horas)

PACIENTES	IRP BASAL	IRP 24HRS.
1	72.72	65.94
2	59.52	
3	69.29	30.87
4	92.56	
5	58.44	84.24
6	68.2	18.55
7	78.81	56.55
8	18.36	12.66
9	75	78
10	53.33	54.54
11	50.45	41.75
12	38.8	38.63
13	10.38	20.43
14	55.27	8.51
15	16.89	18.8
16	15.33	27.05
17	55.9	35.96
18	14.7	21.6
19	81.35	33.33
20	46.21	87.8
21	47.91	90.36
22	49.62	91.34
23	51.33	39.36
24	53.03	47.5
25	54.74	17.81
26	56.45	23.3
27	58.15	56.45
28	59.86	61.85
29	61.57	27.7
30	63.27	79.29
31	64.98	8.69

Figura 5. En las siguientes figuras se muestra la expresión de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP-P) en plaquetas de pacientes tratados con Clopidogrel. Mostrando una buena respuesta de inhibición plaquetaria (Toma Basal).







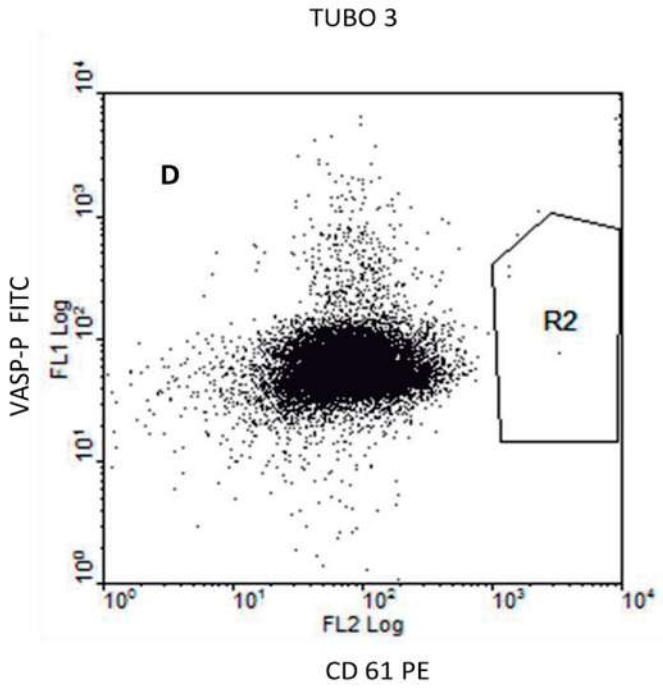


FIGURA 5. En la **figura A** se muestra la región de las plaquetas en base a su tamaño y complejidad celular (tubo control). En las **figuras de B,C y D** se presentan la expresión de CD 61 en el eje de las X y la expresión de VASP-P en el eje de las Y, mostrando la región R2 en donde se analiza la intensidad media de fluorescencia de VASP-P.

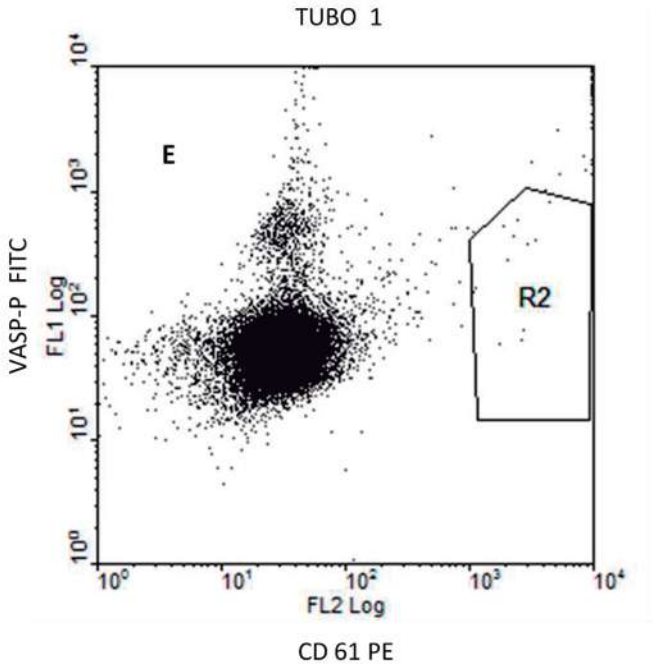
En la **figura B** (tubo 1) se observa la expresión de VASP-P estimulado con prostaglandina E (PGE1)

En la **figura** (tubo 2) se observa la expresión de VASP-P estimulado con prostaglandina E (PGE1) y adenosin trifosfato (ADP).

En la **figura D** (tubo 3) se observa la expresión de el control negativo (control de isotipos), incubado con prostaglandina E (PGE1) y adenosin trifosfato (ADP).

En la evaluación de este paciente su índice de reactividad plaquetaria (IRP) en la toma basal fue de 18.36%,observando muy buena inhibición de la reactividad plaquetaria, podemos visualizar en la figura B, C y D un gran indice de fluorescencia

En la figura **E, F** y **G** se muestra la intensidad media de fluorescencia de la muestra de 24 horas analizada en el citometro de flujo posteriormente a la evaluación se obtuvo un IRP de 12.66% observando una mejor inhibición plaquetaria (buen respondedor al clopidogrel) a las 24 hrs.



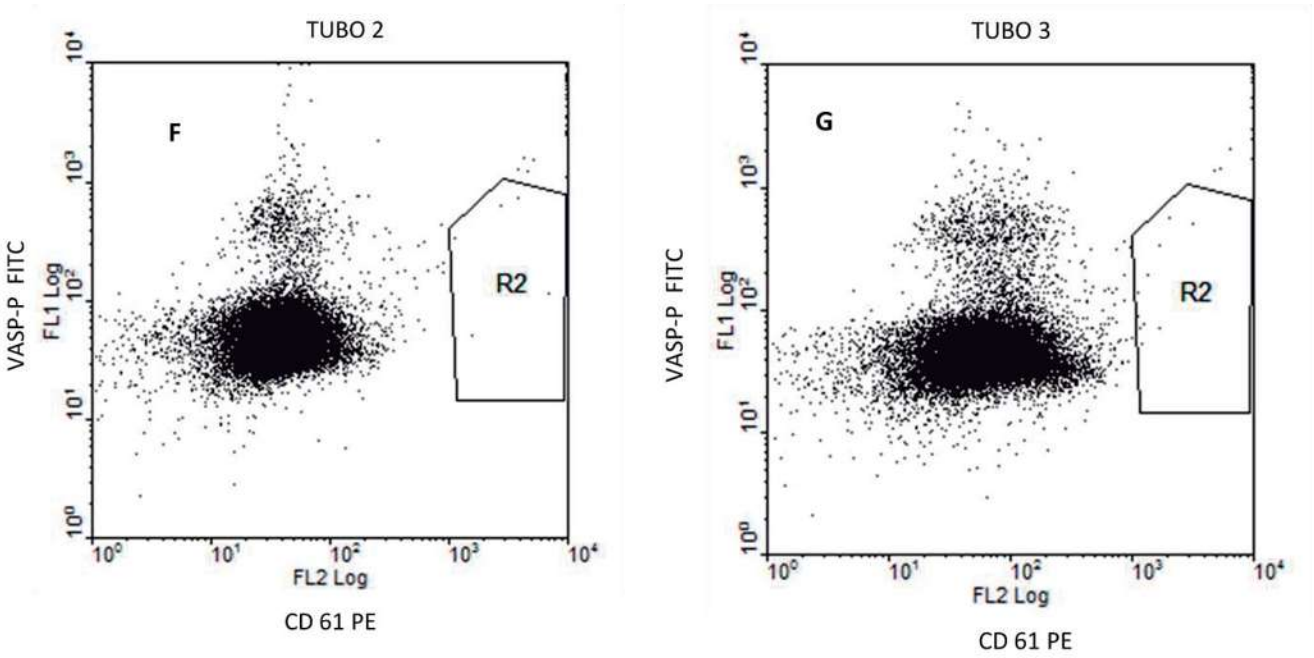
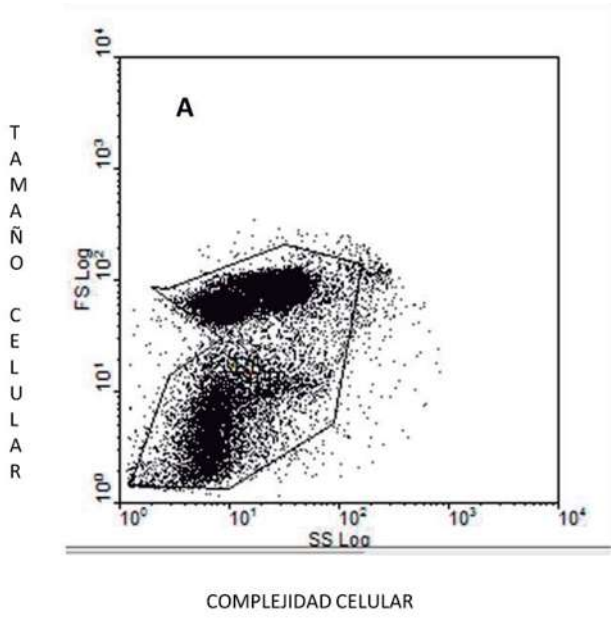
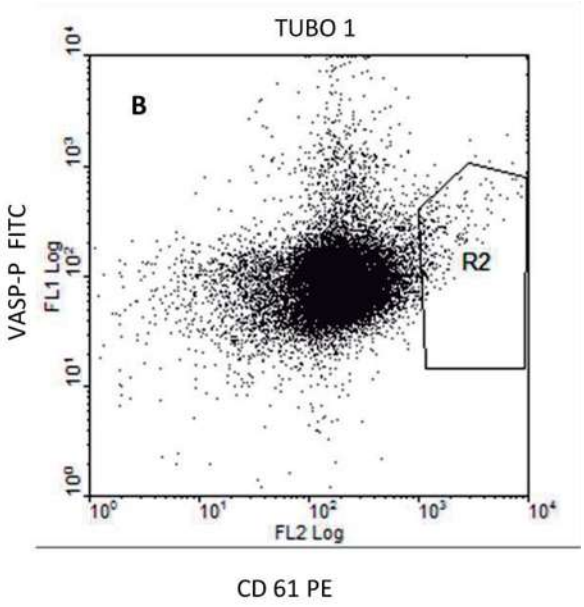
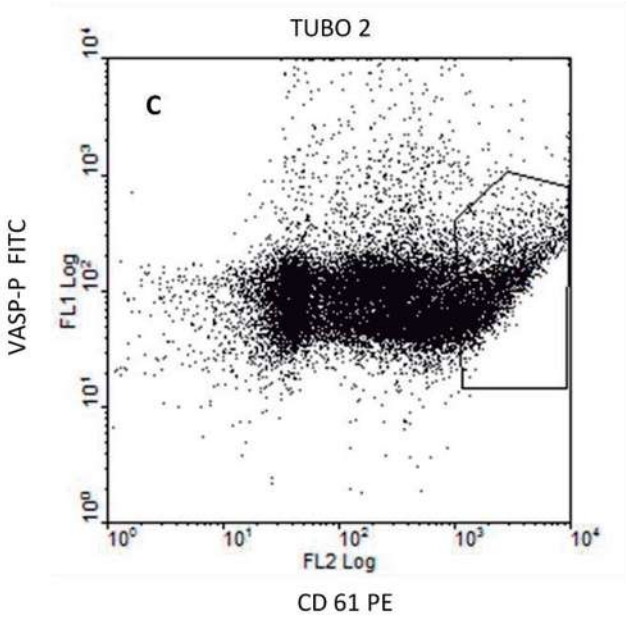
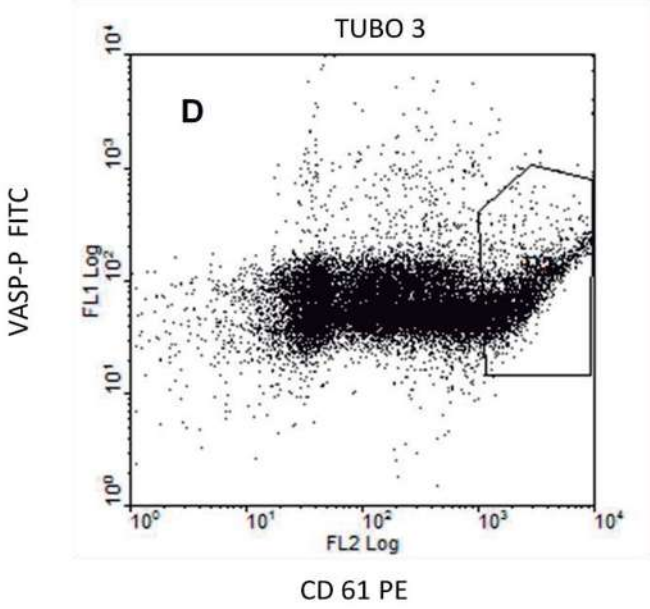


Figura 6. En las siguientes figuras se muestra la expresión de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP-P) en plaquetas de pacientes tratados con Clopidogrel. Mostrando una mediana inhibición plaquetaria (Toma Basal).



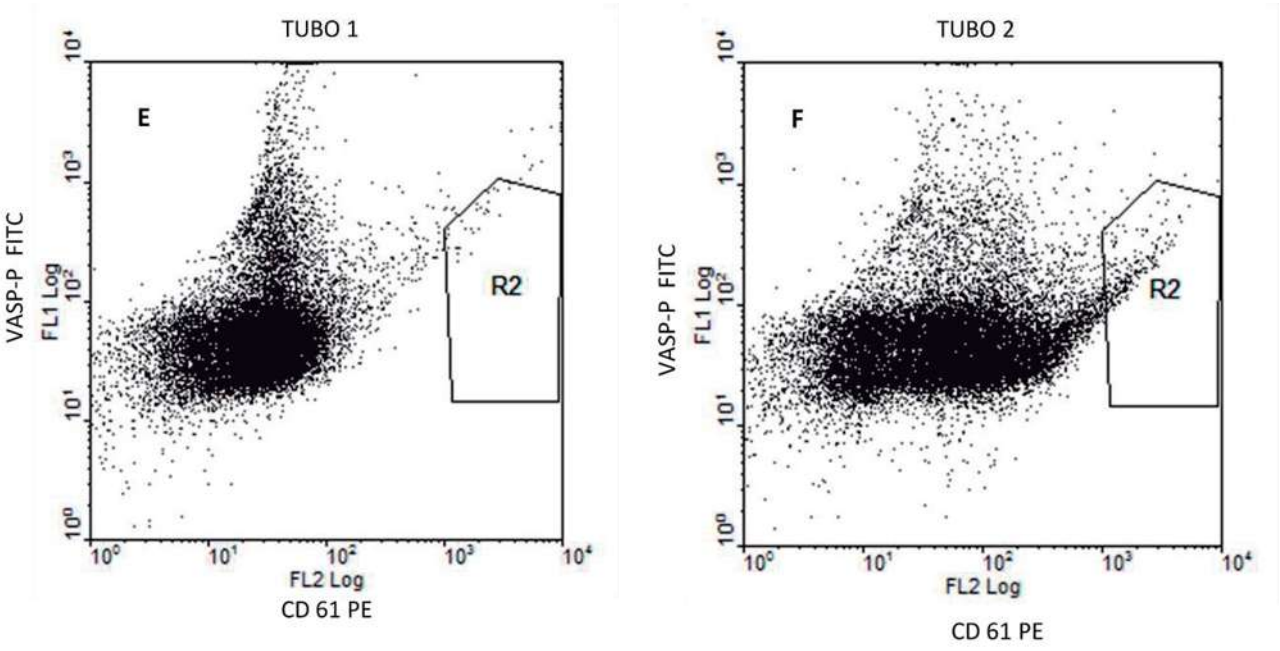

TUBO 1
B
R2
VASP-P FITC
FL1 Log
FL2 Log
CD 61 PE


TUBO 2
C
VASP-P FITC
FL1 Log
FL2 Log
CD 61 PE


TUBO 3
D
VASP-P FITC
FL1 Log
FL2 Log
CD 61 PE

Se observan las graficas como se explico en la figura 1. En la evaluación de este paciente su índice de reactividad plaquetaria (IRP) en la toma basal fue de 58.44%, observando una mediana inhibición de la reactividad plaquetaria, podemos visualizar en la figura B, C y D un mayor desplazamiento de plaquetas hacia la derecha pero poca emisión de fluorescencia.

En la figura **E, F** y **G** se muestra la intensidad media de fluorescencia de la muestra de 24 horas analizada en el citometro de flujo posteriormente a la evaluación se obtuvo un IRP de 84.24% observando una deficiente inhibición plaquetaria (mal respondedor al clopidogrel) a las 24 hrs.



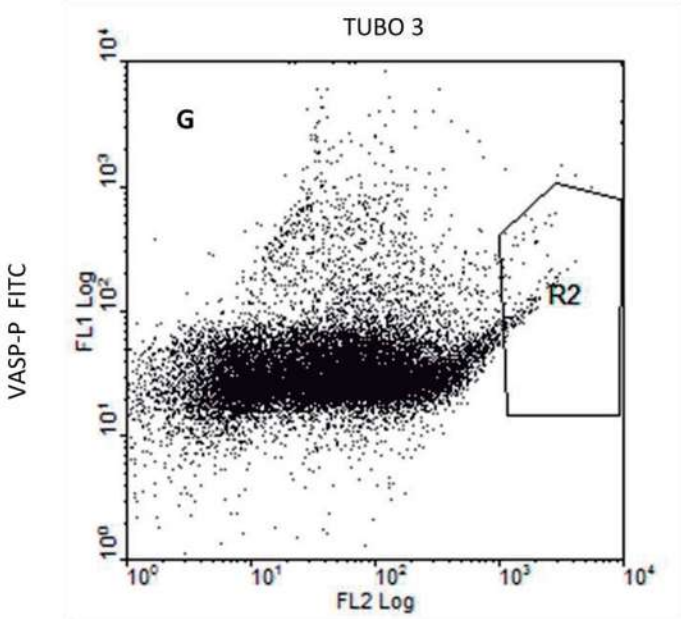
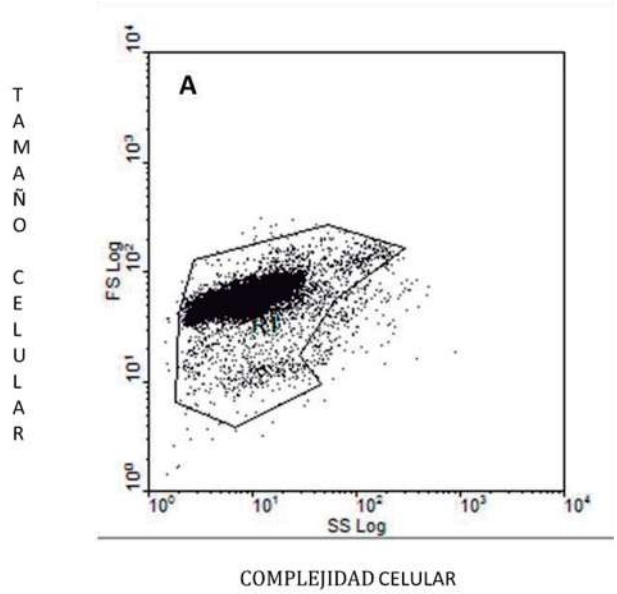
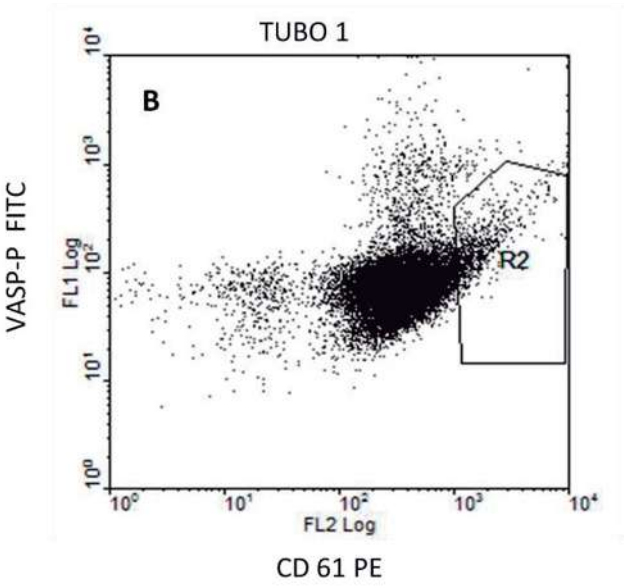
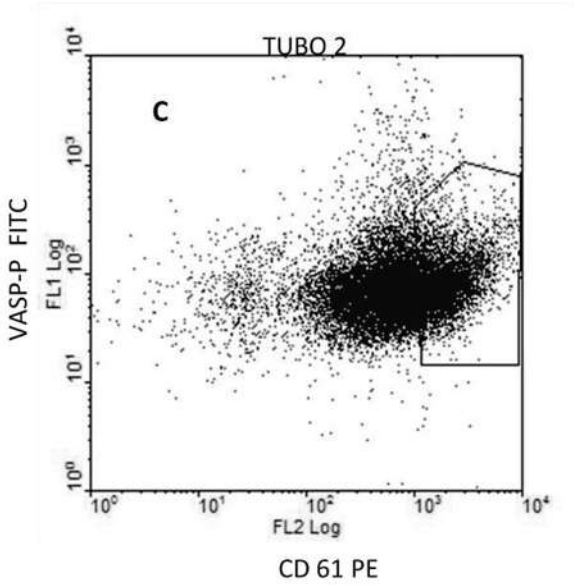
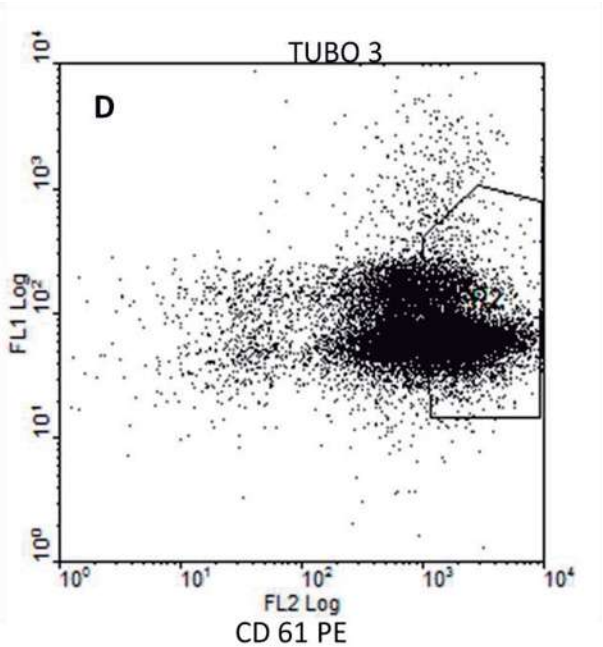


Figura 7. En las siguientes figuras se muestra la expresión de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP-P) en plaquetas de pacientes tratados con Clopidogrel. Mostrando una muy deficiente inhibición plaquetaria (Toma Basal)



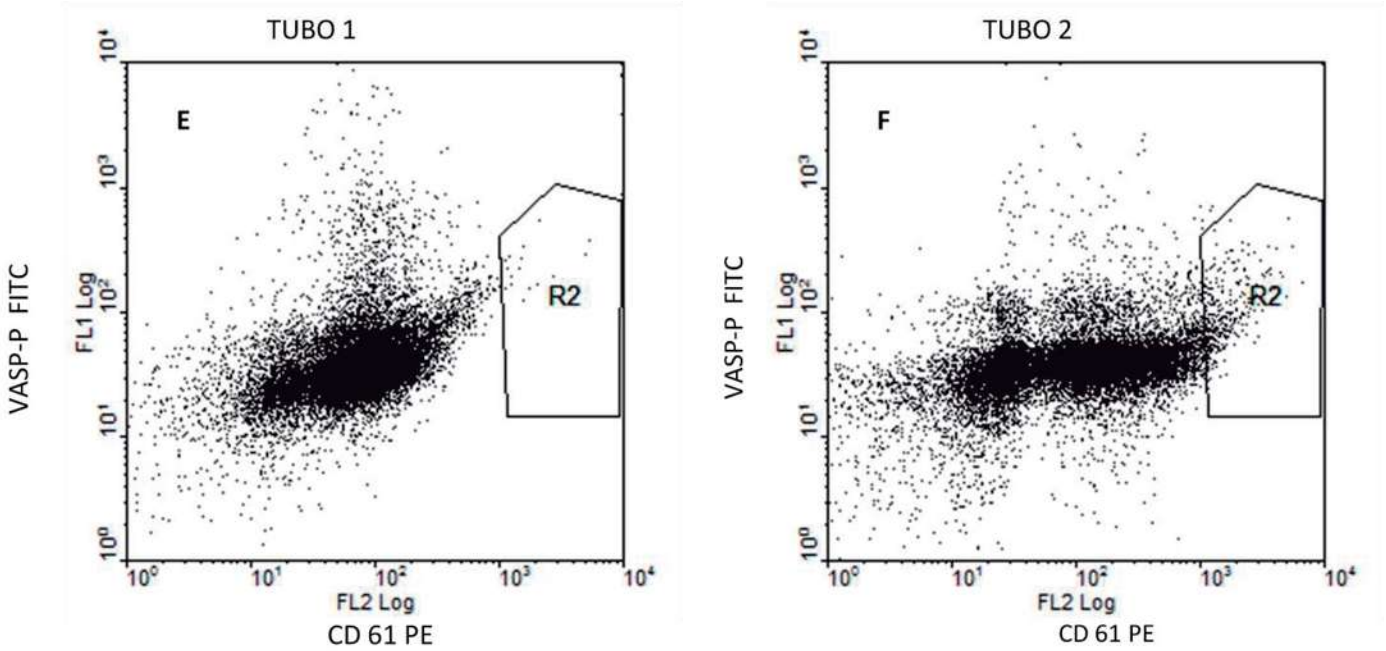

TUBO 1
B
R2
VASP-P FITC
FL1 Log
FL2 Log
CD 61 PE

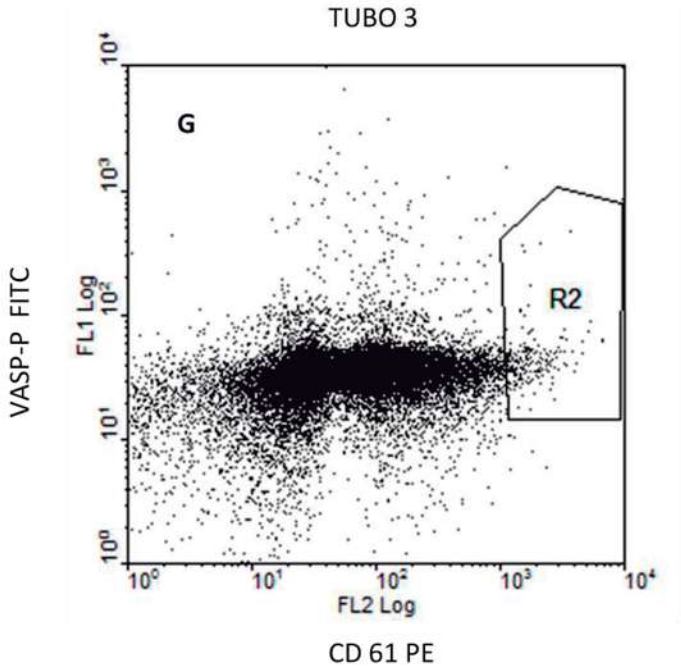

TUBO 2
C
VASP-P FITC
FL1 Log
FL2 Log
CD 61 PE


TUBO 3
D
R2
VASP-P FITC
FL1 Log
FL2 Log
CD 61 PE

Se observan las graficas como se explico en la figura 1. En la evaluación de este paciente su índice de reactividad plaquetaria (IRP) en la toma basal fue de 75%, observando una deficiente inhibición de la reactividad plaquetaria (mal respondedor al clopidogrel), podemos visualizar en la figura B, C y D un mayor desplazamiento de plaquetas (mayor cantidad) hacia la derecha pero poca emisión de fluorescencia.

En la figura **E, F** y **G** se muestra la intensidad media de fluorescencia de la muestra de 24 horas analizada en el citometro de flujo posteriormente a la evaluación se obtuvo un IRP de 78% observando una deficiente inhibición plaquetaria (mal respondedor al clopidogrel) a las 24 hrs.





Respecto al índice de Reactividad Plaquetaria (IRP) encontrado, 6 pacientes (19.35%) presentaron un IRP ≥69% (media IRP= 78.28%), el cual se identificó en la toma basal, 6-8 horas después de la administración del bolo de 300-600 mg de CLopidogrel y se conservó en la toma de 24 horas posterior a la administración del medicamento (85.17%). 25 pacientes (80.64%) presentaron una significativa inhibición de la reactividad plaquetaria, mostrando una media de IRP de 47.31%en la toma basal, dato que se conservó a las 24 horas (media 33.38%).

9. DISCUSIÓN

La activación y agregación plaquetaria desempeñan un papel importante en la patogénesis de la trombosis arterial, lo cual conduce a síndrome coronario agudo y a complicaciones trombóticas durante y después de intervenciones coronarias percutáneas, de ahí que el ácido acetil salicílico sea uno de los agentes antiplaquetarios más empleados.

Estudios clínicos demuestran su eficacia tanto en prevención primaria como en secundaria de infarto del miocardio, accidente cerebrovascular y muerte cardiovascular. A pesar de sus probados beneficios, el riesgo relativo de eventos vasculares recurrentes entre los pacientes que lo toman permanece relativamente alto, y se estima en 8% a 18% después de dos años. La resistencia terapéutica al ácido acetil salicílico podría explicar en parte este riesgo. Aunque aún no se establecen los criterios de diagnóstico formal y un sistema válido de medición, la resistencia al ácido acetil salicílico puede afectar entre 5% a 45% de la población. Dada la prevalencia de la enfermedad cardiovascular, el impacto potencial de la resistencia a este medicamento es amplio.

Otra clase de agentes que actúan mediante el bloqueo de la agregación plaquetaria son los derivados tienopiridínicos, que incluyen el Clopidogrel.

El ácido acetil salicílico y el Clopidogrel, se convirtieron en la terapia de elección en pacientes que serán sometidos a intervención coronaria con *stent*. Sin embargo, existe una considerable heterogeneidad a la respuesta individual de los pacientes expuestos a la terapia dual con estos fármacos.

La resistencia al ácido acetil salicílico y al clopidogrel surge como entidad clínica con consecuencias potencialmente severas, como infarto del miocardio recurrente, accidente cerebrovascular y muerte (6). El mecanismo de resistencia a estos medicamentos es indefinido, pero existen factores clínicos, celulares y genéticos que influyen en la falla terapéutica . Si se entienden los mecanismos relacionados con la falla terapéutica y si se

mejoran los métodos diagnósticos, puede emerger una nueva era de terapia antiplaquetaria individualizada, con mediciones rutinarias de la actividad plaquetaria en la misma forma que las mediciones de colesterol, tensión arterial o glucosa en sangre, con el objetivo de mejorar el cuidado de millones de pacientes.

En su sentido más amplio, la resistencia clínica al ácido acetil salicílico se refiere a pacientes que presentan eventos isquémicos a pesar de recibirlo. Desde el punto de vista del laboratorio, se refiere a quienes no logran un adecuado grado de inhibición plaquetaria con el medicamento. Otros autores la definen como la imposibilidad del ácido acetil salicílico en reducir la producción de tromboxano A2 y, por ende, la agregación y activación plaquetaria.

RESISTENCIA AL CLOPIDOGREL

El concepto de resistencia al clopidogrel emergió en la literatura médica con el fin de reflejar la falla de la inhibición plaquetaria *in vitro*, aunque su definición aún no se establece. Se propone que el término resistencia incluya a aquellos en quienes el clopidogrel no alcanza su efecto farmacológico, y la falla de la terapia se refleje en pacientes que cursan con eventos isquémicos recurrentes . La prevalencia de pacientes que no responden al clopidogrel se estima entre 4% a 30%, 24 horas después de su administración.

En la mayoría de los estudios de investigación en México o en Latinoamérica respecto a la resistencia de antiplaquetarios, la evaluación de la función plaquetaria se ha llevado a cabo por medición in vitro, en la mayoría de los casos, mediante agregometria por transmisión de luz. Aunque este método es el más utilizado, posee algunas desventajas como reproducibilidad limitada y complejidad en la preparación de la muestra. La técnica de la citometria de flujo no es muy recurrente en este tipo de estudios y existe poca bibliografía sobre la evaluación de la reactividad plaquetaria

En el presente estudio, se utilizó la técnica de fosforilacion de VASP/$P2Y_{12}$ con el fin de obtener el índice de Reactividad Plaquetaria (IRP) el cual permitiera la monitorización de la actividad plaquetaria en estos pacientes. Asi el VASP se convierte en nuestra técnica de elección por citometria de flujo una técnica multiparamétrica muy útil para la evaluación funcional en células individuales ha proporcionado en los últimos años múltiples métodos, basados en la bioquímica celular y que han permitido revelar cambios más precoces en el estado de activación plaquetaria que los revelados por métodos clásicos, como el de agregación; se sugiere que el ensayo de la fosforilacion de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores VASP es considerada una buena prueba para evaluar la eficacia del tratamiento con Clopidogrel, además destacan la ventaja de utilizar en la técnica la sangre total como muestra, obteniendo resultados confiables, que colocan a esta prueba en el concepto de muy conveniente para estudios clinicos

Los estudios de citometria de flujo en sangre total han demostrado la existencia de plaquetas activadas circulantes en la angina inestable y en el infarto agudo del miocardio. También se ha demostrado que existe un aumento de la reactividad plaquetaria en pacientes con enfermedad coronaria estable y en la angioplastia coronaria, incluso, se ha reportado que el análisis de los marcadores de activación plaquetaria por citometria de flujo antes de la angioplastia puede ayudar a predecir un incremento en el riesgo de eventos isquémicos después de este proceso.

Tomando en cuenta los valores de punto de corte reportados en la literatura el que cuenta con mayor aceptación es el propuesto por el grupo de Siller Matula (Siller-Matula J, Lang I, Christ g, et.al. Calcium channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel J am Coll Cardiol 2008;52:1557-63) en el año 2008, ya que permite identificar claramente a los pacientes con resistencia a Clopidogrel. Al término del presente estudio, 6 pacientes (19.35%) presentaron un índice de reactividad plaquetaria mayor al 69%, tanto en toma basal como en la toma de 24 horas, lo cual los identifica como bajos respondedores al tratamiento

con Clopidogrel, o resistentes a tratamiento con Clopidogre, mientras que 25 pacieentes (80.64 %) fueron buenos respondedores al tratamiento con Clopidogrel presentando una significativa inhibición de la reactividad plaquetaria. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura internacional, en la cual se ha identificado una prevalencia del 3 al 20% de la población que presenta resistencia al Clopidogrel. Con base en lo anterior, podemos concluir que la población estudiada presenta una prevalencia de Resistencia a terapia con Clopidogrel similar a la reportada en otras poblaciones. El presente estudio es el primero realizado en población Mexicana en el cual se identifica Resistencia a Clopidogrel mediante ensayo de VASP fosforilado por citometría de Flujo.

10. CONCLUSIONES

Se identificó una prevalencia de 19. 35% de Baja Respuesta a Clopidogrel. Esto coincide con lo reportado en la literatura para otras poblaciones. El presente estudio representa el primer ensayo clínico realizado en población Mexicana en el cual se identifica Resistencia a Clopidogrel mediante ensayo de VASP fosforilado por citometría de Flujo.

11. BIBLIOGRAFIA

1.(http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c083.htm)

Bhatt D, Marso S, Hirsch A, Ringleb P, Hacke W, Topol E *Am J Cardiol* 2002 Sep 15 90:6 625

2.Waksman R, Ajani AE, Pinnow E, Cheneau E, Leborgne L, Dieble R, Bui AB, Satler LF, Pichard AD, Kent KK, Lindsay J: Twelve versus six months of clopidogrel to reduce major cardiac events in patients undergoing gamma-radiation therapy for in-stent restenosis: Washington Radiation for In-Stent restenosis Trial (WRIST) 12 versus WRIST PLUS. ***Circulation*** 2002 Aug 13 106:7 776-8

3.Kamath S, Blann AD, Chin BS, Lip GY.. A prospective randomized trial of aspirin-clopidogrel combination therapy and dose-adjusted warfarin on indices of thrombogenesis and platelet activation in atrial fibrillation. ***J Am Coll Cardiol*** 2002 Aug 7 40:3 484-90

4.Effects of Aspirin and Clopidogrel versus Oral Anticoagulation on Platelet Function and on Coagulation in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation (CLAFIB). Muller I, Massberg S, Zierhut W, Binz C, Schuster A, Rudiger_Von Hoch S, Braun S, Gawaz M ***Pathophysiol Haemost Throm***b 2002 May 32:1 16-24

5.Gerschutz GP, Bhatt DL Cleve The CURE trial: using clopidogrel in acute coronary syndromes without ST-segment elevation. ***Clin J Med*** 2002 May 69:5 377-8, 380, 382

6.Jeremo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A. Individual variations of platelet inhibition after loading dose of clopidogrel. J Intern Med 2002; 252: 233-8.

7.Muller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schoring A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. Thromb Haemost 2003; 91: 1123-25.

8.Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carrol RC. Frequency
of non-responder antiplatelet activity of clopidogrel during pre-treatment for cardiac catheterization. Am J Cardiol 2004; 93: 456-8.

9.Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Platelet aggregation according
to body mass index in patients undergoing coronary stenting should clopidogrel loading dose be adjusted? J Invasive Cardiol 2004; 16: 169-74.

10.Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability
in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. J Am Coll Cardiol 2005; 45: 246-51.

11.Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting:
response variability, drug resistance and the effect of pre-treatment platelet reactivity.
Circulation 2003; 107: 2908-13.

12.Wu KK. Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. J Int Med 1996; 239: 17-34

13.Nurden AT. New thoughts on strategies for modulating platelet function through the inhibition of surface receptors. Haemostasis 1996; 26 (Suppl 4): 78-88

14.Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschope D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Shankey TV. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. Thromb Haemost 1998; 79: 885-896

15.Konstantopoulos K, Grotta JC, Sills C, Wu KK. Shear-induced platelet agregation in normal subjects and stroke patients. Thromb Haemost 1995; 74 (5): 1329-1334.

16.Jennings LK, White MM. Expression of ligand-induced binding sites on glycoprotein IIb/IIIa complexes and the effect of various inhibitors. Am Heart J 1998; S179-S183.

17.Cox D. Methods for monitoring platelet function. Am Heart J 1998; S160-S169

18.Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometric analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets. Definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. Thromb Haemost 1999; 82: 1145-1152.

19.Monteiro MC, Sansonetty F, Gonçalves MJ, O'Connor JE. Flow cytometric kinetic assay of calcium mobilization in whole blood platelets using Fluo-3 and CD41. Cytometry 1999; 35: 302-310.

20.Schafer AI. Antiplatelet therapy. Am J Med 1996; 101: 199-209.

21.Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. Circulation 1999; 100: 1667-1672.

22.Michelson AD, Ellis PA, Barnard MR, Matic GB, Viles AF, Kestin AS: Downregulation of platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, ADP or an in vivo wound. Blood 1991; 77: 770-779

23.Defreyn G, Bernat A, Delebassee D, Maffrand JP. Pharmacology of ticlopidine: a review. Semin Thromb Haemost 1989; 15: 159-166

24.Hardisty RM, Powling MJ, Nokes TJC. The action of ticlopidine on human platelets. Studies on aggregation, secretion, calcium mobilization and membrane glycoproteins. Thromb Haemost 1990; 64: 150-155

25.Gachet C, Cazenave JP, Ohlman P, Bouloux C, Defreyn G, Driot F, Maffrand JP. The thienopyridine ticlopidine selectively prevents the inhibitory effects of ADP but not adrenaline on AMPc levels raised by stimulation of adenylate cyclase of human platelets by PGE1. Biochem Pharmacol 1990; 40: 2683-2687

26.Heptinstall S, May JA, Glenn JR, Sanderson HM, Dickinson JP, Wilcox RG. Effects of ticlopidine administered to healthy volunteers on platelet function in whole blood. Tromb Haemost 1995; 74 (5): 1310-1315.

27.Cattaneo M, Akkawat B, Lecchi A, Cimminiello C, Capitanio AM, Mannucci PM. Ticlopidine selectively inhibits human platelet responses to adenosine diphosphate. Thromb Haemost 1991; 66 (6): 694-699

28.Puri RN, Colman RF, Colman RW. Platelet activation by 2 - (4-bromo-2,3-Dioxobutyllthio) adenosine 5'-diphosphate is mediated by its binding to a putative ADP receptor, aggregin. Eur. J. Biochem 1996; 236: 862-870

29.Gachet C, Hechler B, Leon C, Vizi C, Lepay C, Ohlman P, Cazenave J. Activation of ADP receptors and platelet function. Thromb Haemost 1997; 78 (1): 271-275

30.Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. Physiol Rev 1989; 69 (1): 58-178.

31.Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-triphosphate receptor and promote its phosforylation. J Biol Chem 1996; 271: 5545-5551

32.Dean WL, Sullivan DM. Structural and functional properties of a Ca2+-ATPase from human platelets. J Biol Chem 1982; 257 (23): 14390-14394

33.Enouf J, Bobe R, Lacabaratz-Porret C, Bredoux R, Corvazier E, Kovàcs T, Papp B. The platelet Ca2+ transport ATPase system. Platelets 1997; 8: 5-13

34.Farrell TP, Hayes KB, Sobel BE, Scheneider DJ. The lack of augmentation by aspirin of inhibition of platelet reactivity by ticlopidine. Am J Cardiol 1999; 83: 770-774.

35.Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2004;20(1) Lic. *Patricia Caunedo Almagro*. Instituto de Hematología e inmunología

36.Siller- Matula J, Lang I, Christ G, et.al. Calcium channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. J am Coll Cardiol 2008;52:1557-63.