



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

**“ACTIVIDAD PLAQUETARIA Y ENDOTELIAL EN PACIENTES CON
ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA SOMETIDOS A CATETERISMO
CARDÍACO Y QUE RECIBAN TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO”.**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD.

QUE PRESENTA:
QFB. GUADALUPE GISSELA MARÍN HERNÁNDEZ.

ASESOR DE TESIS:
D.C.MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

MORELIA, MICHOACÁN, JULIO DEL 2010.

**INDICE.
CONTENIDOS.**

CÁPITULOS.

1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2-19.
3. JUSTIFICACIÓN.....	20.
4. HIPÓTESIS.....	20.
5. OBJETIVOS.....	21.
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22.
7. RESULTADOS.....	34-45.
8. DISCUSIÓN.....	46-53.
9. CONCLUSIONES.....	54.
10.REFERENCIAS.....	55-59.

INDICE DE TABLAS.

TABLA1. Contenido de los gránulos Citoplásmicos de las Plaquetas.....	7.
TABLA2. Características Basales.....	31.
TABLA 3. Relación del IRP 24 horas con el género.....	40.
TABLA 4. Relación P-Selectina e Hipertensos.....	41.

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. Conversión del Clopidogrel en Metabolito Activo.....	11.
FIGURA 2. Mecanismo de Acción de los Antagonistas de ADP.....	12.
FIGURA 3. Variabilidad de Respuesta al Clopidogrel.....	14.
FIGURA 4. Estructura de la molécula P-Selectina.....	21.

INDICE DE GRÁFICOS.

GRÁFICO 1. Índice de reactividad Plaquetaria Basal, 24 horas, 1 mes.....	33.
GRÁFICO 2. IRP mostrados por los pacientes del estudio.....	34.
GRÁFICO 3. Factor de Von Willebrand de Controles, Basal, 24 Horas, 1Mes.....	36.
GRÁFICO 4. Resultados de FvW individuales en muestras basales, 24 horas, 1 mes.....	37.
GRÁFICO 5. P-Selectina de Sujetos sanos, Basal, 24horas, 1mes.....	38.
GRÁFICO 6. Resultados individuales de P-Selectina basal, 24 horas, 1 mes...	39.

ABREVIATURAS.

- ECV.** Enfermedad cardiovascular.
- ICP.** Intervención Coronaria Percutánea.
- ADP.** Adenosin difosfato de Sodio.
- MACCE.** Eventos cardio-cerebro vasculares mayores.
- IRP.** Índice de reactividad plaquetaria.
- VASP.** Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.
- ELISA.** Ensayo ligado a Enzimas.
- FvW** Factor de Von Willebrand.
- SCA.** Síndrome Coronario Agudo.
- FT.** Factor tisular.
- TAX2.** Tromboxano A2.
- COX-1.** Ciclooxygenasa 1
- AMPc.** Adenosin monofosfato ciclico
- PI-3K.** Fosfatidil Inositol 3-Cinasa.
- NO.** óxido nítrico.
- ET-1.** Endotelina 1.
- PAI-1.** Inhibidor del activador el plasminógeno
- PGE1.** Prostaglandina E1.
- CML.** Células musculares lisas.
- LDL.** Lipoproteínas de baja densidad.
- ICAM-1.** Molécula de Adhesion Intracelular.
- IAM.** Infarto agudo de miocardio.
- IMF.** Índice de fluorescencia media.

AGRADECIMIENTOS.

Con gran cariño y admiración a la **D.C. Martha Eva Viveros Sandoval**, por sus enseñanzas, por la paciencia, por su gran interés de transmitir el conocimiento, por su estímulo y apoyo en mi crecimiento como profesional y especial por la confianza que tuvo en mi siempre.

Al **Dr. Carlos Arturo Areán Martínez**, por su invaluable apoyo e importantes aportaciones que realizó a este trabajo de investigación. Por su colaboración en la preparación de mis seminarios de avances, así como su fundamental ayuda durante el reclutamiento de pacientes y muestras confiables.

Al **Biol. Carlos Bejar Lozano** y los Laboratorios de análisis Clínicos **SERVIMED** por su generoso apoyo en el establecimiento de la técnica utilizada durante este estudio y por brindarnos las facilidades en sus instalaciones, durante la realización de este trabajo.

Al **D.C. Alain Raimundo Rodríguez Orozco, D.C. Bertha Fenton Navarro y D.C. Sergio Gutiérrez** Por las valiosas aportaciones, correcciones y sugerencias que realizaron a este trabajo, así como el gran apoyo a mi persona y a mi crecimiento como profesionalista.

Al área de **Hemodinamia** del hospital general "**Dr. Miguel Silva**" por su gran apoyo en el reclutamiento y seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio.

A mis compañeras de laboratorio **Adriana, Sandra, Guille** y **Fátima**, por su gran apoyo durante la realización de este trabajo y el cariño que me han brindado siempre.

DEDICATORIAS.

A mi esposo **Jorge Erick Fabián Villegas**, por su amor y apoyo incondicional en el crecimiento de todos los aspectos de mi vida, por ser mi motor y gran inspiración, y por compartir a mi lado los mejores y peores momentos.

A mi papá **Raúl Marín Lázaro**, por su incondicional amor y apoyo, por creer en mí siempre, por sembrar en mí grandes valores, por la sabiduría de tus palabras que me han hecho todo lo que soy.

A mi mamá **Oliva Hernández Uribe**, por el amor de cada día, porque nunca me has abandonado, por vivir junto a mí los momentos de buenos y gran adversidad, por ser el personaje de mayor admiración que tengo en la vida. Gracias mamá por ver en mí, lo mejor que tengo.

A mis hermanos **Raúl** y **Pamela**, por darme su apoyo siempre que los necesito, por quererme tal y como soy, y porque han permanecido junto a mí, en los mejores y peores momentos de mi vida.

A mis mejores amigas **Saila, Ivette** y **Kika**, por brindarme su apoyo y cariño en las situaciones difíciles, **por** no juzgarme, por los mejores momentos de diversión juntas y por la gran confianza que me han brindado.

1. RESUMEN.

ANTECEDENTES. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de mortalidad en todo el mundo. La intervención coronaria percutánea (ICP) se ha convertido en el procedimiento más frecuentemente usado para lograr la revascularización coronaria. El advenimiento de los fármacos antiplaquetarios bloqueadores del receptor de adenosin difosfato (ADP), el P2Y₁₂, en pacientes con ICP, ha reducido dramáticamente el porcentaje de eventos cardio-cerebro vasculares mayores (MACCE) (1). Sin embargo no todos los pacientes experimentan el mismo beneficio del tratamiento antiplaquetario y algunos continúan sufriendo eventos isquémicos recurrentes, incluyendo la trombosis causada por la implantación del stent, atribuido en gran parte a una inhibición insuficiente del blanco o diana sobre el cual actúa el fármaco antiplaquetario (2,3).

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 cardio-cerebrales vasculares mayores en lapsos cortos de tiempo, provocados por un estado de activación tanto plaquetaria como endotelial a pesar del tratamiento antiplaquetario. Este problema ha llegado a ser tan importante que se ha acuñado el término “Resistencia a Clopidogrel”. En la población mexicana no existen estudios publicados que indiquen el grado de respuesta a Clopidogrel.

HIPÓTESIS. Existe una respuesta eficiente al tratamiento con Clopidogrel en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a cateterismo cardiaco.

OBJETIVOS. Evaluar la respuesta al tratamiento con Clopidogrel, en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a cateterismo cardiaco, mediante la determinación de biomarcadores de actividad plaquetaria y endotelial. Así como correlacionar estas determinaciones con el estado clínico de los pacientes incluidos en el estudio.

MÉTODOS. Estudio de cohorte prospectivo longitudinal con dos grupos, en cual participaron 21 individuos con enfermedad arterial coronaria, de los cuales 15 (71.42%) fueron sometidos a Angioplastia Coronaria, y 6 (28.57%) sometidos a Angiografía Diagnóstica. La determinación de IRP fue realizada a través de la técnica de fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) por citometria de flujo y la determinación de biomarcadores de actividad plaquetaria / endotelial mediante ensayos de ELISA.

RESULTADOS. Encontramos que el 88.52% de los pacientes exhibieron buena respuesta inhibitoria del medicamento. Sin embargo, existe un 11.48% de los pacientes que presentan baja respuesta al antiplaquetario. Obtuvimos concentraciones elevadas de FvW en muestras basales, 24 horas, 1 mes en comparación con el grupo control observando $p=0.01$, $p=0.01$ y $p=0.01$ respectivamente. Encontramos también concentraciones elevadas de P-Selectina basal y P-Selectina 24 horas al compararlas con concentraciones de grupo control $p=0.012$ y $p=0.022$ respectivamente. Encontramos concentraciones incrementadas de P-Selectina Basal y 24 horas en hipertensos $p=0.033$ y $p=0.039$ y concentraciones elevadas de P-Selectina basal en los pacientes que sufrieron MACCE.

CONCLUSIONES. Encontramos claras diferencias de efectividad en la respuesta al tratamiento con Clopidogrel. La prueba de fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores VASP es una prueba confiable para efectuar ajustes en las dosis de mantenimiento de pacientes con ICP. Se obtuvo una buena respuesta Antiplaquetaria con dosis de 600mg de Clopidogrel, sin complicaciones hemorrágicas. Se encontraron niveles incrementados de FvW, a pesar del tratamiento antiplaquetario al que estuvo sometida nuestra población de estudio. Encontramos niveles incrementados de P-Selectina soluble en las muestras de pacientes basales y 24 horas. La P-Selectina soluble podría ser un biomarcador predictivo de MACCE.

2. MARCO TEORICO.

En un amplio sentido, la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares comprende procesos crónicos tales como la aterosclerosis, la dislipidemia, la diabetes, la hipertensión, la lesión endotelial y también procesos agudos como la vasoconstricción, la erosión/ rotura de la placa aterosclerótica, la trombosis, o la embolia (4,5). Cada uno de estos procesos tiene sus propios componentes genéticos y ambientales que se expresan en un espectro más o menos continuo de fenotipos en los individuos con enfermedad cardiovascular. Los eventos oclusivos coronarios por aterosclerosis representan una de las principales causas de muerte en numerosos países (6). Las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de mortalidad en 31 de 35 países de América. En nuestro país, es la primera causa de muerte en hombres de 50-60 años, y la tercera causa de muerte en mujeres de la misma edad (Fuente: Encuesta nacional de Salud, INEGI 2004).

Son muy numerosos los elementos celulares y las moléculas que intervienen en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, y por lo tanto el campo de estudio para su dilucidación es muy amplio. Determinadas moléculas y elementos celulares desempeñan un papel decisivo en determinados momentos del desarrollo de las distintas patologías cardiovasculares. Entre esa amplia gamma, las plaquetas tienen un papel bien definido en la patogenia de enfermedad coronaria, tanto en la fase crónica de desarrollo de lesión arterial (7) como en la etapa aguda de aterotrombosis (8). Es gracias a la comprensión del Síndrome Coronario Agudo (SCA) como un proceso aterotrombótico, que las plaquetas han asumido un papel preponderante en la medicina cardiovascular (9).

Esto ha establecido el uso generalizado de agentes antiplaquetarios, como la aspirina, las tienopiridinas y los antagonistas de los receptores de la glicoproteína IIb-IIIa, en la prevención de las enfermedades isquémicas coronarias. Sin embargo, hay evidencias recientes de que no todos los pacientes

reciben el tratamiento antiplaquetario adecuado, ya sea por el fenómeno de la “resistencia” o “respuesta variable” al fármaco (9).

Recientes avances en las ciencias básicas han vinculado algunos factores de riesgo con la disfunción endotelial que inicia la enfermedad aterosclerótica y desencadena la progresión de sus complicaciones trombóticas. El endotelio vascular regula la actividad contráctil, mitogénica y trombótica de la pared vascular. Los factores de riesgo alteran la homeostasis y la hemostasis de la pared vascular y promueven las señales inflamatorias. Se activan las plaquetas y los monocitos, lo que favorece la expresión del factor tisular (FT), desencadenando el sistema de la coagulación con la generación de trombina y la formación del trombo vascular. Así pues, se ha identificado a la disfunción endotelial como promotor de la enfermedad aterotrombótica. Existe actualmente un conocimiento cada vez más amplio en biología vascular básica basada en los procesos de adhesión tanto célula-célula como célula matriz extracelular, los cuales están mediados por diversas moléculas (biomarcadores), que están siendo trasladados a la investigación clínica cardiovascular e incluso también a la práctica clínica con resultados muy esperanzadores (10).

2.1 Enfermedad Arterial Coronaria.

La enfermedad de las arterias coronarias se caracteriza por la acumulación de depósitos de grasa en las células endoteliales que revisten la pared de una arteria coronaria y, en consecuencia, obstruyen el flujo de sangre.

Los depósitos de grasa (llamados ateromas o placas) se forman gradualmente y se desarrollan irregularmente en los grandes troncos de las dos arterias coronarias principales, las que rodean el corazón y lo proveen de sangre; este proceso gradual es conocido como aterosclerosis.

Los ateromas provocan un engrosamiento que estrecha las arterias. Cuando los ateromas se agrandan, algunos se rompen y quedan fragmentos libres en la circulación sanguínea o bien se forman pequeños coágulos sanguíneos sobre su superficie.

Para que el corazón se contraiga y bombee la sangre normalmente, el músculo cardíaco requiere una provisión continua de sangre rica en oxígeno que le proporciona las arterias coronarias. Pero cuando la obstrucción de una arteria coronaria va en aumento, se puede desarrollar una isquemia (suministro de oxígeno inadecuado) del músculo cardíaco que causa lesiones graves. La causa más frecuente de isquemia del miocardio es la aterosclerosis de las arterias coronarias. Las principales complicaciones de esta enfermedad son la angina de pecho y el ataque cardíaco (infarto de miocardio).

En los países desarrollados, las enfermedades cardiovasculares son la causa principal de muerte entre las personas de ambos sexos, siendo la enfermedad de las arterias coronarias la causa principal de las enfermedades cardiovasculares. El índice de mortalidad está influenciado tanto por el sexo, como por el origen étnico; es más elevado en los varones que en las mujeres, sobre todo en aquellos de edad comprendida entre los 35 y los 55 años.

La patogenia de la enfermedad coronaria implica dos procesos interdependientes: la aterosclerosis y la trombosis; de ahí que se emplee el término aterotrombosis para definir el proceso subyacente. La aterotrombosis un proceso crónico dinámico de la pared vascular en el cual, durante las fases de inflamación y actividad trombótica, subyace la presentación de los síndromes coronarios agudos (SCA) (12).

2.2 Plaquetas.

Las plaquetas son fragmentos citoplásmicos anucleados que se producen como consecuencia de la maduración de los megacariocitos de la médula ósea. Se forman a partir de vesículas que se desprenden en grandes cantidades de las membranas externas de los megacariocitos. Circulan en la sangre en forma de disco biconvexo (discocitos) de aproximadamente 3 mm^2 de diámetro, $4 - 7 \text{ mm}^3$ de volumen y 10 pg. de peso. Poseen carga eléctrica negativa en su superficie.

Su concentración normal en la sangre es de 150 a $350 \times 10^6/\text{mL}$ y su tiempo de vida media en sangre es de 7 a 10 días (13,14).

Poseen una estructura celular compleja que incluye una membrana externa, formada por una bicapa lipoproteica con glicoproteínas que funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas (ADP, TXA₂, trombina), proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de Von Willebrand) y para ligandos fibrosos como el colágeno, además de poseer enzimas importantes para el funcionamiento celular y de fosfolípidos (14,15). Es responsable de la interacción de la célula con el medio circundante a través de receptores entre las que figuran las integrinas las cuales se caracterizan por enlazarse a proteínas, siendo las más estudiadas la GPIIb-IIIa y la GPIb-IX.

Las plaquetas carecen de ADN, pero contienen ARN mensajero derivado de los megacariocitos y la maquinaria de transcripción necesaria para la síntesis de proteínas (16). Contienen además orgánulos, como mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, que tienen características y funciones similares a los de otras células. También ribosomas en muy pocas cantidades, fundamentalmente en las células jóvenes, lo que concuerda con la moderada actividad de síntesis proteica (17).

En su citoplasma, se encuentran 2 tipos de gránulos: los gránulos α específicos (proteínas adhesivas, factores de coagulación, Beta-tromboglobulina, Factor 4 plaquetario) y gránulos densos inespecíficos (Calcio, ADP, Serotonina, ATP). Cuyo contenido es secretado tras la activación plaquetaria y sus componentes interaccionan con proteínas plasmáticas, células y componentes de la matriz extracelular (17).

TIPO DE GRÁNULOS	CONTENIDO
GRANULOS DENSOS	Serotonina ADP ATP Pirofosfato Calcio
GRANULOS α	Fibrinógeno Factor de Von Willebrand PDGF Beta-tromboglobulina Factor 4 plaquetario Trombospondina PAI-1 Albumina Fibronectina Vitronectina

Tabla 1. Contenido de los gránulos Citoplásmicos de las Plaquetas.

Su citoesqueleto constituye un entramado de proteínas diversas: la miosina asociada a los filamentos de actina son las más abundantes. Entre sus funciones más importantes en las plaquetas se encuentran: la regulación de las propiedades de la membrana tales como contornos, estabilidad y mantenimiento de la forma de la plaqueta en reposo, mediación de la distribución lateral de las glicoproteínas receptoras de membrana y barrera para la exocitosis (18,19). El sistema tubular denso, es un sistema de membranas que aparecen en la vecindad de los microtúbulos y rodea los organelos, con apariencia, y funciones similares a las del retículo endoplásmico liso de otras células, además regula la activación plaquetaria mediante el secuestro o liberación de calcio, de forma similar a los túbulos del músculo esquelético (21).

Las plaquetas, además de su bien conocida función en la trombosis y la hemostasis, contribuyen a la activación endotelial y modulan respuestas inflamatorias, con lo que favorecen el inicio y la formación de lesiones ateroscleróticas y sus posteriores complicaciones trombóticas (22,23).

Existen evidencias crecientes de la caracterización de los estados de activación, agregación y bloqueo de la plaqueta circulante, los cuales permiten evaluar el riesgo que la plaqueta supone en el desarrollo de las lesiones, y por lo tanto informar sobre cómo, cuánto, y cuando intervenir sobre la plaqueta para su prevención (16,17). Para caracterizar el estado de activación se ha utilizado la expresión de la estructura y funciones en la membrana plasmática propias de la plaqueta activada (unión de fibrinógeno, unión de anticuerpos a neoantígenos de activación tales como GPIIb-IIIa activada, P- Selectina, CD63, etc.), la generación de macropartículas generadas de plaquetas, la determinación de umbrales de activación y de productos de degranulación (β -tromboglobulina, P-selectina soluble, Factor plaquetario 4, metabolitos de tromboxano).

El estado de agregación se ha caracterizado mediante la determinación del número y tamaño de los agregados y el conteo de plaquetas individuales.

Mientras que la caracterización del estado de bloqueo estructural y funcional se ha hecho mediante la medida de los niveles plasmáticos de bloqueante, el grado de saturación de plaqueta con bloqueante y el grado de inhibición funcional. Sin embargo no se han establecido criterios de eficacia probada para su uso general en la clínica (18.19).

2.3 Terapia Antiplaquetaria.

En los últimos años aumentó extraordinariamente el interés en el uso de agentes antiplaquetarios en la cardiopatía isquémica, dada la capacidad de estos agentes para interferir con una serie de estados fisiopatológicos en los cuales están implicadas las plaquetas.

El término antiagregante plaquetario o simplemente antiplaquetario, se emplea en un sentido amplio para designar a todos los fármacos que tienen una o varias de las siguientes propiedades:

- a) Inhibición de la función medible de las plaquetas, como adhesividad, agregación o acciones equivalentes.
- b) Aumento de la supervivencia de las plaquetas marcadas con radioisótopos, en condiciones clínicas, en las cuales se reduce esta variable, ya que la reducción del tiempo de supervivencia de las plaquetas refleja el aumento del consumo de plaquetas.
- c) Reducción de los agregados plaquetarios circulantes.
- d) Inhibición de la formación de trombo inducida por plaquetas "in vivo" (20).

Las plaquetas desempeñan un papel clave en la aparición de las complicaciones trombóticas 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 Ácido Acetilsalicílico, las tienopiridinas (Ticlopidina y Clopidogrel) y los antagonistas de los receptores de la glicoproteína IIb-IIIa, en la prevención de las enfermedades isquémicas coronarias (9). Sin embargo, en los últimos años se han acumulado datos que indican que un número considerable de pacientes continua presentando complicaciones trombóticas a pesar de cumplir el tratamiento antiagregante plaquetario combinado de Ácido Acetilsalicílico 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 de Ácido Acetilsalicílico y el receptor P2Y₁₂ del ADP en el caso de Clopidogrel, y que se ha denominado “resistencia” a los fármacos antiagregantes plaquetarios (21).

2.3.1 Clopidogrel.

El Clopidogrel inhibe selectivamente la unión del difosfato de adenosin (ADP) al receptor plaquetario P2Y₁₂ con la subsecuente activación del complejo GPIIb-IIIa, con lo cual se inhibe la agregación plaquetaria. Existen múltiples evidencias experimentales de que, de todos los agonistas liberados tras la activación plaquetaria, el ADP es uno de los más importantes para reclutar plaquetas y propagar el trombo arterial (19). Por lo cual la inhibición del receptor plaquetario de ADP, el P2Y₁₂ con el empleo de Clopidogrel ha representado un importante avance en el tratamiento farmacológico de los pacientes con enfermedad aterotrombótica, especialmente en los síndromes coronarios agudos (SCA) y en el intervencionismo coronario percutáneo (ICP) (22).

El Clopidogrel es un profármaco y por ello deben ser metabolizado por el hígado (por el citocromo hepático P450, CYP3A4) para convertirse en fármaco

activo con propiedades antiplaquetarias. El metabolito activo se une de manera covalente al residuo cisteína de uno de los receptores del ADP (P2Y₁₂), lo que conduce a una modificación irreversible del receptor durante toda la vida de la plaqueta (24).

Las plaquetas expuestas al fármaco son afectadas durante todo su periodo de vida. La inhibición de la agregación plaquetaria es dosis-dependiente y estadísticamente significativa a las 2 horas después de la administración oral. La función plaquetaria normal se recupera cuando ocurre el recambio de las plaquetas (aproximadamente a los 7 días) (25).

Sin embargo a pesar de los efectos beneficiosos asociados al tratamiento con Clopidogrel en estos contextos de alto riesgo, las experiencias clínicas y de laboratorio han permitido identificar algunas de sus limitaciones, la más relevante de las cuales es la amplia variabilidad existente en la respuesta inhibitoria plaquetaria. En esta variabilidad de la respuesta al Clopidogrel se han involucrado diferentes factores clínicos, genéticos y celulares. Es importante señalar que los hallazgos farmacodinámicos han demostrado tener repercusiones pronósticas, lo cual subraya la necesidad de mejores estrategias de tratamiento antiagregante plaquetario (26,27).

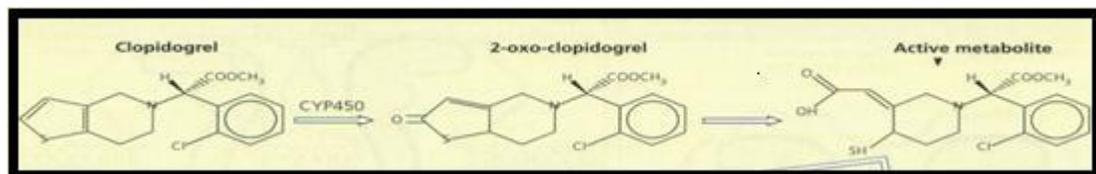


Fig.1 Conversión del Clopidogrel en Metabolito Activo.

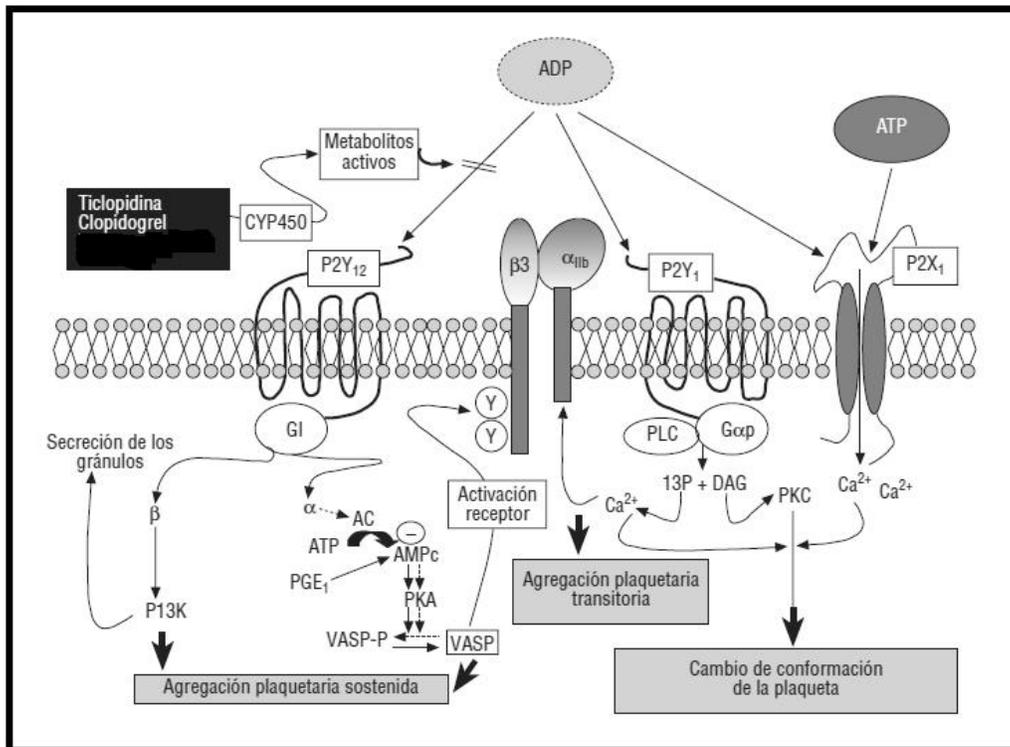


Fig. 2 Mecanismo de Acción de los Antagonistas del ADP.

2.3.2 Variabilidad Interindividual de Respuesta.

El Clopidogrel al ser un profármaco que debe sufrir una biotransformación hepática para convertirse en su metabolito activo. Aproximadamente un 85% del Clopidogrel absorbido en el torrente circulatorio a partir del intestino es hidrolizado por esterasas e inactivado, mientras que el 15% restante se metaboliza en el hígado por un doble proceso de oxidación en el que intervienen varias isoformas del Citocromo P450 (CYP), para convertirse en un metabolito activo (26,27).

El inicio tardío de la acción del Clopidogrel es una de sus limitaciones y exige el empleo de una dosis de carga para reducir el tiempo necesario para el inicio de acción cuando se requiere una inhibición rápida, como ocurre en el contexto de SCA o ICP (28)

El principal problema existente con el Clopidogrel es su amplia variabilidad de respuesta en los individuos tratados, de tal manera que hay un porcentaje relativamente elevado de pacientes que muestran unos efectos subóptimos, lo que ha hecho que se acuñaran para ellos los términos “pobres respondedores” o “resistentes”. Éstos son entre el 5 y el 40% de los pacientes, según las características de la población, así como el tipo de función plaquetaria analizado y los valores de corte empleados (26,27).

La variabilidad en la respuesta al Clopidogrel es un fenómeno bien conocido cuya trascendencia se pone de relieve en el hecho de que en varios estudios han observado una asociación entre la baja respuesta y eventos cardiovasculares adversos (26,27).

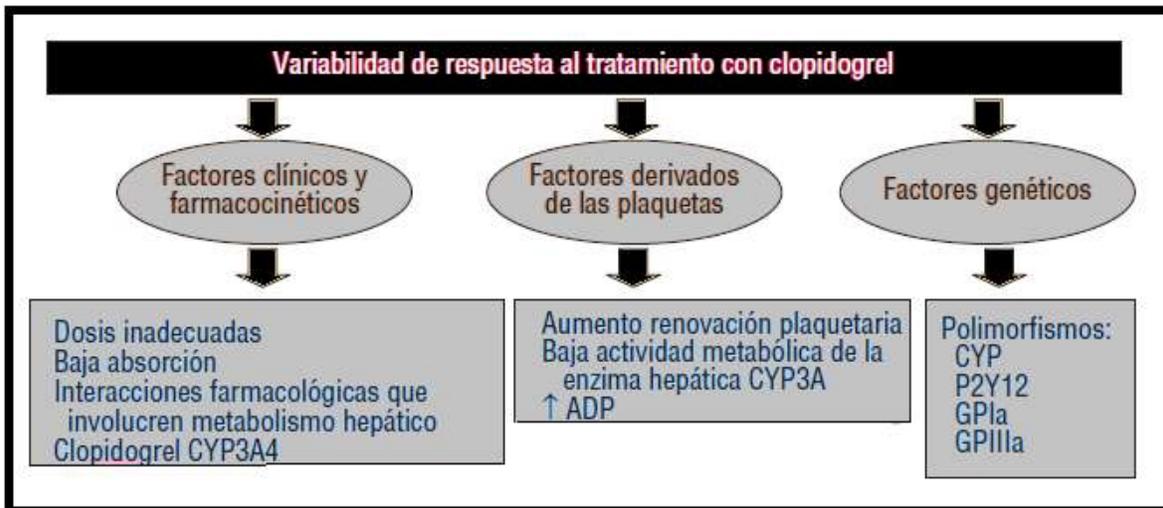


Fig. 3 Variabilidad de Respuesta al Clopidogrel.

2.2.3 DOSIS DE CARGA DE CLOPIDOGREL.

En la práctica clínica común las dosis de carga estándar son de 300 mg de Clopidogrel, 6 horas antes de ICP. Sin embargo en la actualidad existen estudios que evalúan la prevalencia de resistencia a Clopidogrel después de la dosis de carga de 300mg y 600mg, observando que con las dosis de carga de 600mg se obtiene un efecto antiplaquetario más rápido y mejor en comparación con las dosis de 300mg, reduciendo el porcentaje de pacientes con resistencia al Clopidogrel (1).

2.4 Citometría de flujo en Plaquetas

En la década de los 60 comenzó a desarrollarse la técnica de citometría de flujo, pero los primeros trabajos basados en esta técnica aplicados al estudio de las plaquetas, aparecieron a finales de la década de los 80. Los ensayos de citometría de flujo complementan e incluso pueden reemplazar los estudios convencionales de función plaquetaria (29). La funcionalidad plaquetaria puede ser evaluada por variadas metodologías que detectan alteraciones morfológicas, bioquímicas y de la composición de la membrana, asociadas a la activación celular. Entre los principales métodos utilizados para analizar la función plaquetaria se cuentan los métodos basados en la agregación plaquetaria, los basados en la liberación de productos plaquetarios, los métodos basados en el análisis microscópico y el análisis por citometría de flujo.

Es una técnica multiparamétrica muy útil para la evaluación funcional en células individuales mediante 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.

Este ensayo y otras determinaciones complementarias por citometría de flujo pueden resultar útiles para monitorizar los efectos generales de los tratamientos y para detectar eventuales subpoblaciones de plaquetas que respondan de forma heterogénea a la terapéutica. Por otra parte, la capacidad multiparamétrica de la citometría de flujo constituye una aproximación adecuada a la investigación (29) investigación de la utilidad de los ensayos funcionales para optimizar la dosificación antitrombótica de cara a un tratamiento seguro y eficaz (30).

2.3.1 Fosforilación 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 P2Y₁₂, 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 (PI-3K) (27,28).

La prostaglandina E1 es un activador de la fosforilación del VASP, a través de la activación del AMPc dependiente de protein cinasas (33).

Por tanto los niveles de fosforilación y desfosforilación del VASP reflejan la inhibición/activación del receptor P2Y₁₂. (34).

La fosforilación de VASP, asociada a la inhibición del receptor P2Y₁₂, puede ser medida fácilmente mediante Citometría de Flujo, el cual ha sido usado ex vivo para probar la eficacia del Clopidogrel en pacientes con Enfermedad Cardiovascular Isquémica (35).

2.5 Disfunción Endotelial.

La patogenia de la enfermedad coronaria implica dos procesos interdependientes: la aterosclerosis y la trombosis; de ahí que se emplee el término aterotrombosis para definir el proceso subyacente. La aterotrombosis es un proceso crónico dinámico de la pared vascular en el cual, durante las fases de inflamación y actividad trombótica, subyace la presentación de los SCA (36,37).

La disfunción endotelial y la inflamación son las piedras angulares que promueven la enfermedad aterosclerótica. Múltiples factores, tanto locales (estrés oxidativo, fuerzas de cizallamiento) como sistémicos (los factores de riesgo clásicos: diabetes, tabaquismo, hipercolesterolemia e hipertensión arterial), han sido implicados en la iniciación, progresión y perpetuación de la disfunción endotelial (38). Los factores de riesgo tradicionales se han vinculado epidemiológicamente a una alta incidencia de complicaciones aterotrombóticas. Recientes estudios anatomopatológicos, experimentales y clínicos han ayudado a comprender mejor los mecanismos celulares y moleculares subyacentes que vinculan a los factores de riesgo con el proceso aterosclerótico, y por qué un control agresivo de tales factores puede reducir o prevenir nuevos SCA en pacientes con aterosclerosis (39, 40).

Entre las causas de disfunción endotelial, se encuentran los factores de riesgo cardiovascular y los factores hemodinámicos, pues se sabe que el endotelio se daña en los lugares donde hay más turbulencia de la sangre. En particular destaca el papel de los lípidos, ya que el aumento en su concentración plasmática puede llevar a su acumulación en el espacio subendotelial donde, tras sufrir diversas modificaciones, estimulan la expresión de moléculas de adhesión y se inicia el proceso inflamatorio.

La disfunción endotelial marca el inicio de la enfermedad aterotrombótica. El endotelio desempeña un papel central en la homeostasis vascular mediante la producción balanceada de moléculas vasodilatadoras y antimitógenas (óxido nítrico NO y prostaciclina) y de factores vasoconstrictores y mitógenos (endotelina-1 ET-1 y la angiotensina II) (41). El endotelio posee también propiedades antitrombóticas y fibrinolíticas, activando a la antitrombina III, al inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y al activador del plasminógeno tisular (t-PA), e impidiendo la expresión del FT activado y del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). El NO liberado por el endotelio es la molécula clave para el mantenimiento de la homeostasis, además de poseer una función vasorreguladora, disminuye, la agregación plaquetaria y la adhesión de monocitos, evita la proliferación de las células musculares lisas (CML) y preserva de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL)¹⁷. Tiene también un efecto antiinflamatorio, aumentando la producción del NF-κB, un factor de transcripción implicado en la regulación de múltiples genes proinflamatorios que expresan citocinas, ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, lo que facilita la activación y migración de monocitos(42).

2.5.1 Moléculas de Adhesión.

Las moléculas de adhesión son clave en el reclutamiento celular hacia el interior de la pared vascular. Dado que sus formas solubles pueden aparecer en el plasma, diversos trabajos han relacionado sus concentraciones con el riesgo de eventos cardiovasculares.

En poblaciones sanas, la molécula de adhesión ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) muestran mayores concentraciones en sujetos sanos que van a tener un infarto agudo de miocardio (IAM). Además las concentraciones de ICAM-1 predecían eventos coronarios y el desarrollo de aterosclerosis carotídea, y además, había asociación entre ésta y las concentraciones de selectina E- soluble (43). En cuanto a la P-Selectina, el Women's Health Study mostró que era predictora de eventos cardiovasculares (44).

Actualmente ha surgido la hipótesis de que los niveles incrementados del Factor de Von Willebrand en pacientes después de una Intervención Coronaria Percutánea (ICP) reflejan Daño Endotelial (45).

2.4.1. a. Factor de Von Willebrand (FvW)

Existen moléculas que guardan una relación estrecha con procesos de activación plaquetaria, entre ellas destaca el Factor de Von Willebrand, glicoproteína multimérica de elevado peso molecular presente en el plasma sanguíneo y producida de forma constitutiva en el endotelio (en los cuerpos Weibel-Palade), en los megacariocitos (los precursores de las plaquetas) y el tejido conectivo subendotelial.

El FvW interviene tanto en los procesos de adhesión como en los de agregación plaquetaria: las plaquetas tienen dos receptores distintos para el factor de Von Willebrand, la glicoproteína Ib en el complejo GP Ib-V-IX y el complejo GP IIb-IIIa. La unión de la primera está involucrada en el establecimiento del contacto inicial entre plaquetas y la superficie trombogénica, es decir la adhesión, donde el factor de Von Willebrand actúa como puente entre los componentes de la pared vascular y receptores específicos de la superficie plaquetaria. El complejo GP IIb-IIIa se une al factor de Von Willebrand durante la activación plaquetaria mediando la liberación de las proteínas plaquetarias en la superficie y por consiguiente la agregación (45)

Los niveles incrementados del FvW en plasma han sido reportados como marcador de disfunción endotelial en pacientes con infarto agudo miocárdico, y después de la angioplastia coronaria (46).

2.4.1. b. P-Selectina.

La P-Selectina (CD62P), es una molécula de adhesión que pesa 140 KD, y se extiende aproximadamente 40 nm en la superficie endotelial. Ha sido de interés, gracias a la función que desempeña como modulador de la interacción entre las células sanguíneas y el endotelio vascular. Su forma soluble en plasma ha sido utilizada como predictor de eventos cardiovasculares. Se encuentra presente en la superficie externa tanto del endotelio activado como de las plaquetas activadas (47,48).

La P-Selectina es particularmente responsable de la adhesión de ciertos leucocitos (neutófilos, monocitos y linfocitos) y plaquetas al endotelio. Varios modelos han demostrado el importante papel de la p-selectina en los procesos de aterogénesis. El incremento de la expresión de P-Selectina ha sido demostrado en placas ateroscleróticas activas y los niveles incrementados de P-Selectina soluble han sido también demostrados en una variedad de desórdenes cardiovasculares, incluyendo la enfermedad arterial coronaria.



Fig. 4 Estructura de la molécula de P-Selectina.

3. 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 cardio-cerebrales vasculares mayores en lapsos cortos de tiempo, provocados por un estado de activación tanto plaquetaria como endotelial a pesar del tratamiento antiplaquetario. Este problema ha llegado a ser tan importante que se ha acuñado el término “Resistencia a Clopidogrel”.

En la población mexicana no existen estudios publicados que indiquen el grado de respuesta a Clopidogrel.

4. HIPÓTESIS.

Existe una respuesta eficiente al tratamiento con Clopidogrel en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a cateterismo cardiaco.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la respuesta al tratamiento con Clopidogrel en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a angiografía y/o intervención coronaria percutánea, mediante la cuantificación de biomarcadores de actividad plaquetaria y endotelial.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar el efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la persistencia de VASP fosforilado 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 y un mes posteriores al inicio del tratamiento con dosis de carga de Clopidogrel.
- Determinar la concentración plasmática de biomarcadores de disfunción plaquetaria y endotelial: Factor de Von Willebrand, P-Selectina Soluble.
- Correlacionar los estados de activación plaquetaria y endotelial con el estado clínico de los pacientes incluidos en el estudio.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 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.

6.2 Selección de la muestra.

Pacientes con Enfermedad Arterial Coronaria que ingresarán a la sala de hemodinamia con angiografía programada y que reciban dosis de carga de 600mg de Clopidogrel de 6-10 previas en el periodo comprendido de Diciembre de 2008 a Septiembre de 2009.

Todos los pacientes incluidos firmaron la carta de consentimiento informado antes del procedimiento.

6.3 Tipo de estudio.

Estudio de cohorte prospectivo longitudinal con dos grupos.

6.4 Criterios.

Criterios de inclusión.

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

Criterios de exclusión.

- Pacientes con infarto agudo miocárdico con elevación del segmento ST
- Pacientes que fueran sometidos a tratamiento con anticoagulantes orales o antidepressivos.
- 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 eliminación.

- 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 (corroborado por el perfil de lípidos) o hemolizadas.

Grupo Control.

Pacientes que ingresaron a sala de hemodinamia para angiografía coronaria diagnóstica, y en quienes no se realizó intervención coronaria percutánea con implantación de stent.

6.5 Toma de Muestras.

Se obtuvo una primera muestra de sangre (basal) por punción femoral o radial previo a la intervención percutánea y 2 muestras de sangre en las visitas de seguimiento (24 horas y 1 mes) las cuales se obtuvieron por punción venosa en el antebrazo, a cada paciente tanto del grupo experimental como del grupo control, estas muestras serán recolectadas en tubos de sangre con anticoagulante citrato sódico. Las muestras fueron procesadas en un lapso no mayor a 48 horas, para la evaluación de la actividad plaquetaria. La determinación de biomarcadores de disfunción endotelial se realizó en plasma sanguíneo, estos fueron congelados a -70°C hasta el momento de su estudio para la determinación de biomarcadores.

Todas las muestras se analizaron en una misma sesión para cada una de las determinaciones, con el fin de evitar la variación inter-ensayo.

6.6 Metodología.

Para la determinación de los marcadores de activación plaquetaria/endotelial se utilizaron los siguientes métodos:

- **TÉCNICA DE FOSFORILACIÓN DEL VASP POR CITOMETRIA DE FLUJO.** Para la evaluación del estado de fosforilación del VASP, se utilizó como muestra la sangre total y un kit estandarizado de citometria de flujo para análisis de plaquetas. La muestra recolectada previamente en un tubo con citrato de sodio para la obtención de sangre total fue incubada en un primer tubo de propileno con prostaglandina E1 (PGE1) y en un segundo y tercer tubo con PGE1 y adenosin difosfato de sodio (ADP) por 10 min con agitación y fijada con paraformaldehido, posteriormente cada plaqueta fue permeabilizada con un detergente no iónico. Se incorpora el anticuerpo monoclonal primario dirigido contra el VASP, seguido de un anticuerpo secundario anti-VASP conjugado con isotiocianato de fluoresceína, mas el anticuerpo de detección plaquetaria dirigido contra el CD62 marcado con ficoeritrina (anti-CD62-PE). La duración total de la preparación no excede los 30 minutos. El análisis fue realizado en un citómetro EPICS XCL (Beckman Coulter) analizando al menos 5000 plaquetas con una velocidad de lectura media. 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 siguiente fórmula:

$$\%IRP = \frac{IMF (PGE1) - IMF (PGE1+ADP)}{IMF (PGE1)} \times 100.$$

(ANEXO 1)

- **TECNICA DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE FvW** Se utilizo la técnica de ELISA tipo sándwich, con un kit comercial estandarizado. El tipo de muestra usado fue el plasma sanguíneo. La placa de ELISA se encontraba estabilizada con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el FvW, el cual fue incubado con el plasma sanguíneo durante 1 hora con agitación continua, posteriormente se incorporaba una solución que contenía un segundo anticuerpo anti-FvW marcado con peroxidasa en cada pozo de la placa y se incubaba por 1 hora, a continuación se realizaban lavados con un solución amortiguadora de fosfatos y se agregaba el sustrato de la enzima y se incubaba durante 18 minutos dando lugar a una reacción colorida, dicha reacción fue terminada con la incorporación de Ácido sulfúrico. Esta intensidad de color de la reacción fue procesada en un lector de ELISA Stat-Fax a 450 nm usando un filtro de referencia de 630 nm.
- **TECNICA DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE P-SELECTINA SOLUBLE.** Se utilizo la técnica de ELISA tipo sándwich, con un kit comercial estandarizado. El tipo de muestra usado fue el plasma sanguíneo. La placa de ELISA se encontraba estabilizada con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la P-Selectina soluble, en este ELISA se realizaron lavados con solución amortiguadora de fosfatos antes de iniciar con la incubación, a continuación se agregaba el plasma sanguíneo a cada uno de los pozos de la placa y se incorporaba el segundo anticuerpo anti-P-Selectina monoclonal marcada con peroxidasa y se incubaba durante 2 horas con agitación continua, posteriormente se realizaban lavados con solución de fosfatos, y se agregaba la solución que contiene el sustrato de la enzima se incubaba por 15 minutos y se agregaba una solución de paro con ácido sulfúrico, la reacción colorida fue procesada en un lector de ELISA Stat- Fax a 450 nm, usando un filtro de referencia de 630 nm. (ANEXO 1)

6.7 Variables de estudio.

- Resistencia al Clopidogrel: Definida como un índice de Reactividad Plaquetaria (IRP) >69% (Siller-Matula et al. 2008)
- Baja actividad plaquetaria/endotelial por biomarcadores: Niveles inferiores a punto de corte establecido en sujetos sanos: media- 2DS.
- Intervención Coronaria percutánea (ICP).
- Evento Cardio-cerebro vascular mayor (MACCE).
- Hipertensión Arterial.
- Dislipidemia.
- Diabetes.
- Tabaco.

6.8 Análisis Estadístico.

Se utilizó estadística descriptiva (medias y desviación estándar) así como la estadística inferencial (χ^2 , Razón de momios de prevalencia y Coeficiente de Correlación de Spearman de rangos ordenados), con un nivel de significancia estadística $p < 0.05$ y un índice de confianza de 95%. El análisis estadístico se llevo a cabo usando los programas Excel Microsoft Office 1997-2003 y SPSS versión 17.

6.9 Consideraciones éticas y prevención de riesgos.

El presente estudio, se realizó de acuerdo a la normatividad vigente y siguiendo los lineamientos de la más reciente revisión de la declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas.

Este proyecto fue apegado estrictamente a la normatividad vigente por la Secretaría de Salud para los estudios en humanos. El proyecto fue presentado al comité de Ética e Investigación del Hospital General “Dr. Miguel Silva” y se obtuvo la correspondiente aprobación. Se realizó una carta de consentimiento informado (ANEXO 1) la cual fue presentada a cada uno de los pacientes participantes en el estudio para su respectiva firma, la cual enfatizó la naturaleza del estudio, su carácter voluntario, los investigadores responsables, la ausencia de riesgos para su salud, los beneficios esperados, la manera como se pretende cuidar su integridad, la naturaleza confidencial de los datos y la salida voluntaria en caso de que así se desee. A los pacientes que en alguna de las pruebas se detecto como anormal se les informó y orientó para que tuviera asesoría médica especializada y completara su estudio y de ser necesario, la modificación de su tratamiento.

7. RESULTADOS.

Se integró una cohorte de 21 pacientes con enfermedad arterial coronaria, de los cuales 15 (71.42%) fueron sometidos a Angioplastia Coronaria, y 6 (28.57%) sometidos a Angiografía Diagnóstica. De los 21 pacientes estudiados, 15 (71.41%) pertenecían al sexo masculino y 6(28.57%) al femenino. La edad promedio fue de 66.23 años con una desviación estándar de 9.92 años y un rango de 44 a 79 años. Las características basales de los pacientes por grupo de estudio se resumen en la tabla 2.

	Grupo con Angioplastia. n=15		Grupo Control. n=6
Edad, años	68.46±9.56		60.66±9.26
Hombre	11		4
Mujer	4		2
Hx.Familiar	2(13.33%)		3(50%)
Tabaco	9(60%)		3(50%)
Diabetes	11(73.33%)		5(83.33%)
Hipertensión	11(73.33%)		5(83.33%)
Dislipidemia	13(86.66%)		5(83.33%)
Complicaciones	1(6.66%)		1(20%)
Tipo de Stent:			—
Medicado	11(73.33%)		
Convencional			4(26.6%)

Tabla 2.Características Basales

Determinación de Índice de Reactividad Plaquetaria IRP por citometría de flujo.

Se determinaron los IRP en las muestras basales, 24 horas y un mes post Cateterismo cardiaco. La prueba mostró que el 88.52% de los pacientes exhibieron buena respuesta inhibitoria del medicamento. Sin embargo, existe un 11.48% de los pacientes que presentan baja respuesta al antiplaquetario.

Observamos que existe variabilidad interindividual en la respuesta al agente antiplaquetario, en la muestra basal se obtuvieron IRP en un rango de 10.38 a 81.35 %, en la muestra de 24 horas el rango fue de 8.51 a 91.34% y un mes posterior a la angioplastia, el rango fue de 1.00 a 84.00%. Para comparar las medias de los IRP obtenidos, se utilizó una prueba de T de variables dependientes, con un intervalo de confianza de 95% y se compararon las medias de los IRP Basales con los IRP 24 Horas ($p=0.346$); IRP 24 horas con IRP un mes ($p=0.423$) y IRP Basal con un mes ($p=0.850$) (Gráfico 1).



Grafico 1. Índice de reactividad Plaquetaria Basal, 24 horas, 1 mes.

En el Gráfico 2 se muestran los IRP individuales, mostrados en nuestra población de estudio Basal, 24 Horas, 1 mes post angiografía y/o angioplastia. Como se observa en este gráfico, la variabilidad en la respuesta es alta.

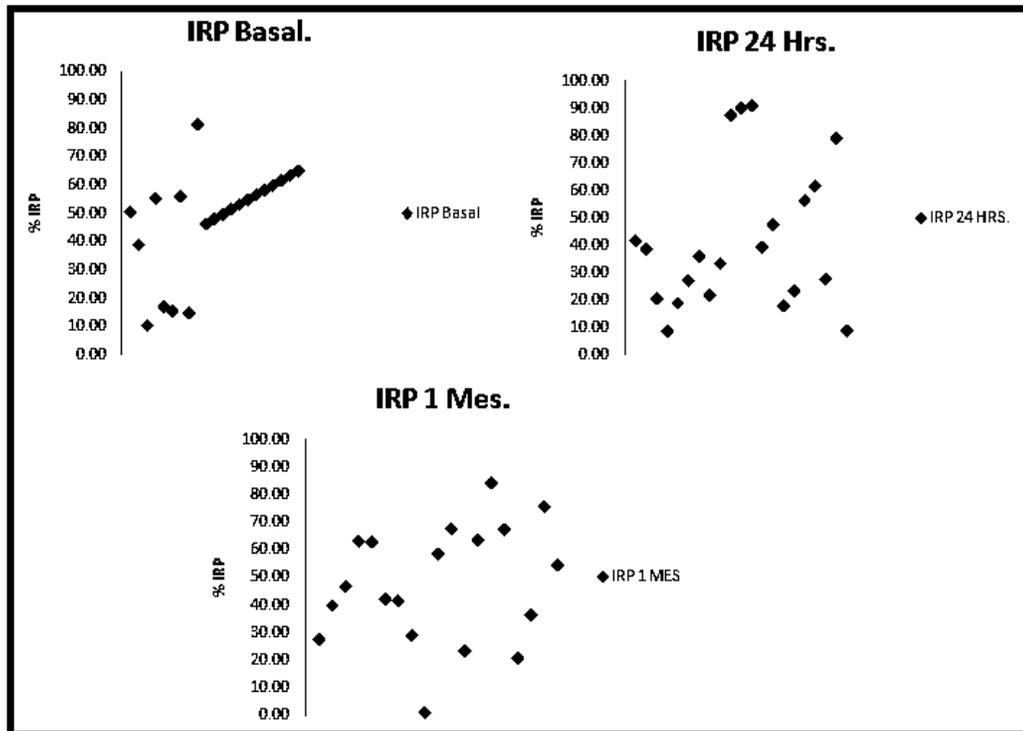


Gráfico 2. IRP mostrados por los pacientes del estudio.

Determinación de la concentración plasmática del Factor de Von Willebrand por Ensayo de ELISA.

Se determinaron las concentraciones plasmáticas del FvW en las muestras basales, 24 horas y un mes posterior al cateterismo cardiaco. Observamos una media 212.46 ± 50.83 con un rango de 101.7 a 300 mU/mL en la muestra basal, una media de 233.51 ± 45.30 con un rango de 148.30 a 298 mU/mL en la muestra a las 24 horas y una media de 218.63 ± 30.54 con un rango de 150.60 a 280 mU/mL en la muestra un mes posterior. Para comparar estos resultados, se utilizó una prueba de T de variables dependientes, con un intervalo de confianza de 95% y se compararon los resultados de FvW Basales con los FvW a las 24 Horas ($p=0.145$); FvW 24 Horas con los FvW al mes ($p=0.206$) y FvW basal con FvW un mes ($p=0.576$) (Gráfico 3).

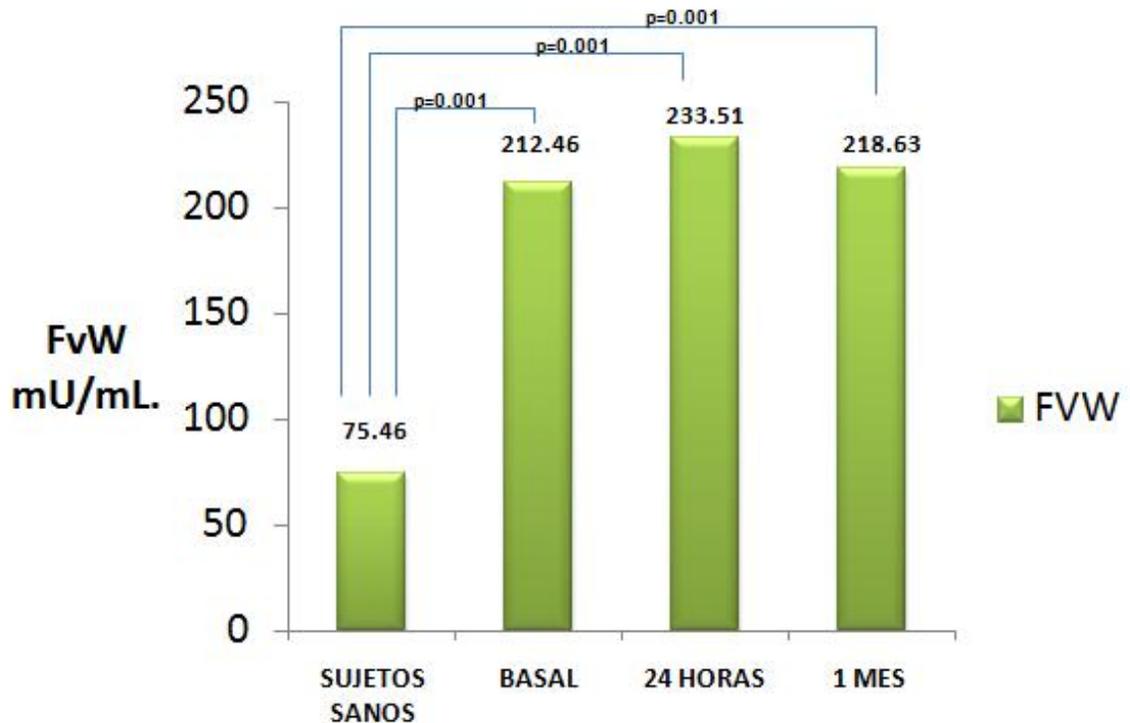


Grafico 3. Factor de Von Willebrand de Controles, Basal, 24 Horas, 1Mes

Además se incluyó un grupo de 20 sujetos sanos, con el fin de establecer valores de referencia para nuestro laboratorio (7.68 - 142.74 mU/mL). Los resultados obtenidos en este grupo de sujetos sanos fueron comparados con los resultados obtenidos en las muestras basales, 24 horas y 1 mes posterior al cateterismo. Encontramos una diferencia significativa al comparar la concentración de FvW de sujetos sanos con las concentraciones que presentaron los pacientes, tanto en la muestra basal, 24 horas y 1 mes (Grafico3)

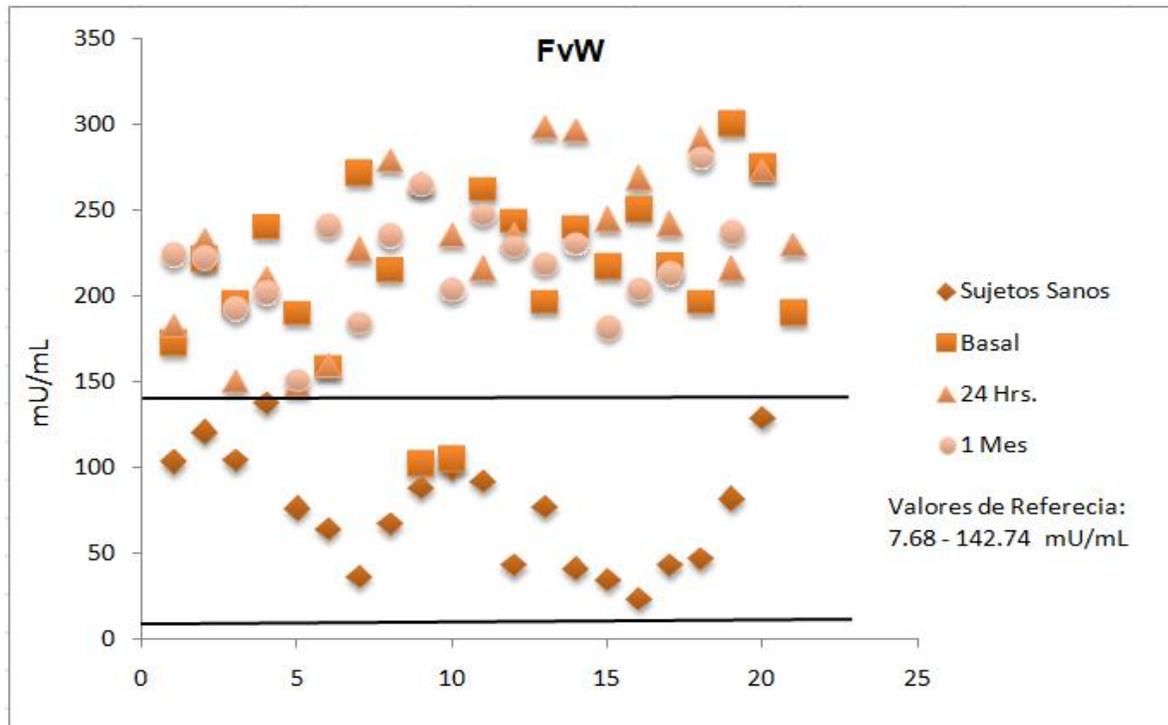


Gráfico 4. Resultados de FvW individuales en muestras basales, 24 horas, 1 mes.

Determinación de la concentración plasmática de P-Selectina soluble por ensayo de ELISA.

Se determinaron las concentraciones en plasma de P-Selectina soluble en las muestras de pacientes. Observamos una media de 177.33 ± 165.16 con un rango de 26.9 a 635.7% en la muestra basal, una media de 177.80 ± 176.33 con un rango de 31.50 a 674.3% en la muestra a las 24 horas y una media de 164.00 ± 203.82 con un rango de 26.40 a 780% en la muestra un mes posterior a angiografía y/o angioplastia.

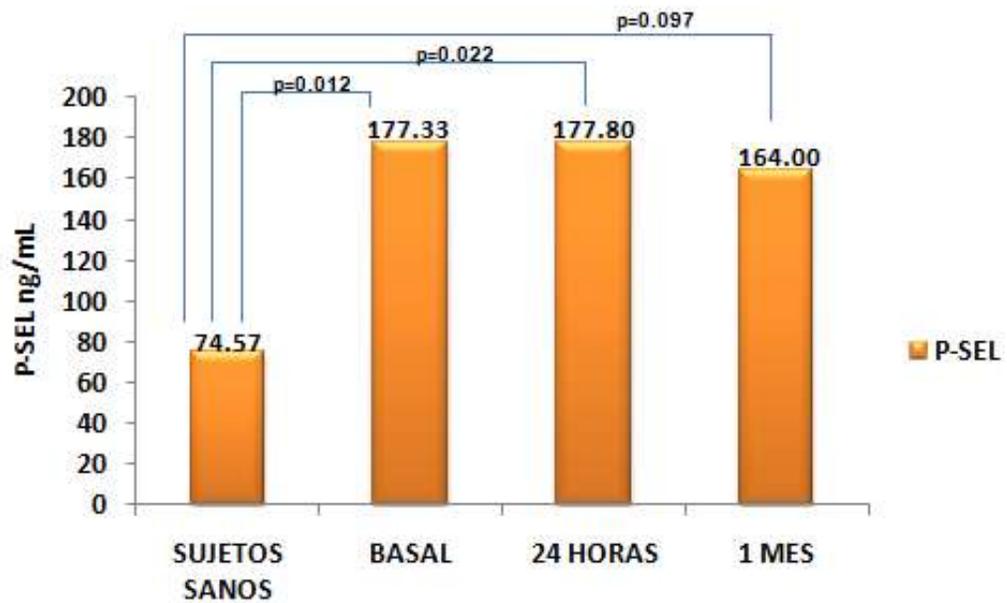


Grafico 5. P-Selectina de Sujetos sanos, Basal, 24 horas, 1 mes.

También se incluyó el grupo de 20 sujetos sanos para establecer valores de referencia para nuestro laboratorio (14.73- 140.41 ng/mL). Al llevar a cabo el análisis estadístico encontramos una diferencia significativa al comparar P-selectina basal con la P-selectina de los sujetos sanos ($p=0.012$), así como P-selectina a las 24 horas comparada con los sujetos sanos ($p=0.022$). En el caso de P-selectina un mes post angiografía y/o angioplastia, comparada con controles no se alcanza una p significativa, sin embargo se observa una tendencia a la significancia estadística ($p=0.097$) (grafico 5)

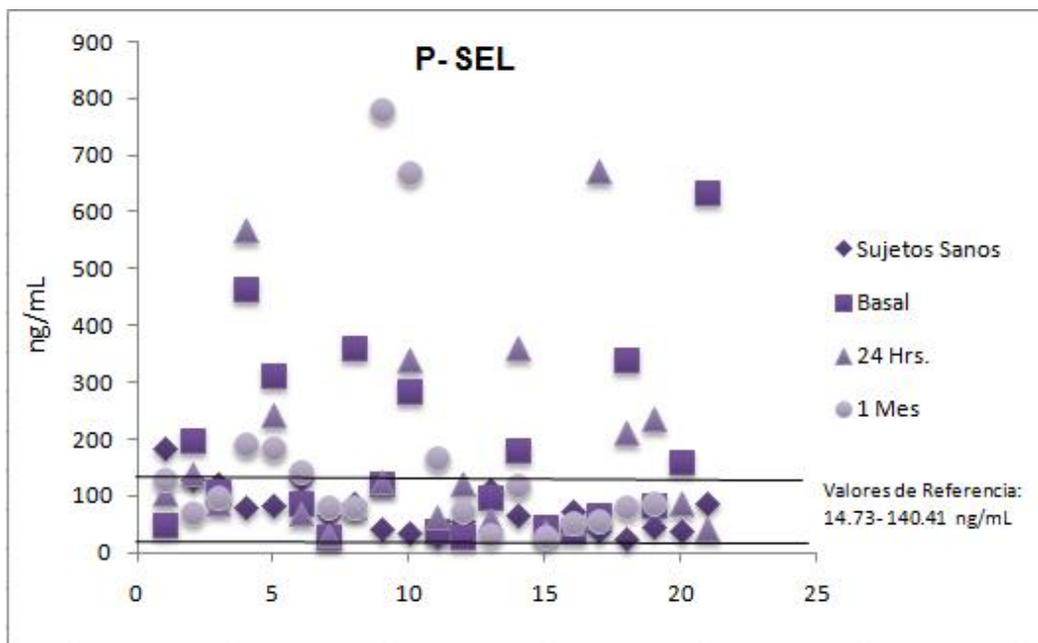


Grafico 6. Resultados individuales de P-Selectina basal, 24 horas, 1 mes.

Variables independientes.

Para evaluar los resultados obtenidos de las variables independientes se aplico una prueba T con un un intervalo de confianza de 95%.

- ❖ Relacionamos el género de los pacientes con los IRP, niveles plasmáticos
- ❖ de FVW y P-selectina Soluble basal, 24 horas y un mes post angiografía/angioplastia. Encontramos una diferencia significativa ($p=0.03$) entre los IRP a las 24 horas, entre hombres y mujeres.

IRP 24 HORAS (%)	n	MEDIA	D.E	P
GÉNERO				
Hombre	15	36.08	20.76	0.03
Mujer	6	56.03	35.48	

Tabla 3. Relación del IRP 24 horas con el género.

- ❖ También realizamos la comparación de los pacientes hipertensos y los no hipertensos con los IRP y los diferentes biomarcadores incluidos en el estudio. Encontramos que los niveles plasmáticos de P-selectina basal y a las 24 horas se encuentran incrementados en los pacientes hipertensos con una diferencia significativa ($p=0.033$ y 0.039 respectivamente) (Tabla 4).

P-SELECTINA SOLUBLE.	n	MEDIA.	D.E	P
BASAL				
Hipertensos	16	213.4	17.23	0.033
No hipertensos	5	61.7	55.4	
24 HORAS				
Hipertensos	16	210.6	190.6	0.039
No hipertensos	5	72.7	33.4	

Tabla 4. Relación P-Selectina e Hipertensos.

- ❖ Dos pacientes de los pacientes incluidos en este estudio presentaron eventos cardio-cerebro vasculares mayores (MACCE) en el periodo de estudio. El evento presentado fue muerte en ambos casos. Al comparar los resultados de dichos pacientes encontramos una diferencia significativa ($p=0.022$) entre los pacientes que murieron, al relacionarlos con niveles plasmáticos muy elevados de P-selectina basal.

P-SELECTINA SOLUBLE BASAL	n	MEDIA.	D.E	p
MACCE	2	397.9	336.2	0.022
Sin MACCE	19	154.1	134.3	

Tabla 5. Relación de la P-Selectina Soluble Basal y MACCE.

8. DISCUSIÓN.

Al analizar los resultados obtenidos en el presente estudio destaca principalmente una marcada eficacia variable del Clopidogrel que existe en el grupo de pacientes incluidos en el estudio.

La variabilidad de respuesta al Clopidogrel es un concepto que ha derivado de la preocupación de que algunos pacientes puedan no estar adecuadamente protegidos de la activación y la agregación plaquetarias y, por lo tanto, están expuestos a un mayor riesgo trombótico (49). De acuerdo a los resultados encontrados en el presente estudio, esta respuesta variable prevalece en los tres grupos: Basal, 24 horas y 1 mes.

En el presente estudio, se utilizó la técnica de fosforilación de VASP/P₂Y₁₂ que con el fin de obtener el índice de Reactividad Plaquetaria (IRP) el cual permitiera la monitorización de la actividad plaquetaria en estos pacientes. El Ensayo original del VASP fue descrito por Schwartz et al en 1997 (50) y modificado por Barragan y cols en el 2003 (51). En el estudio realizado en Strasbourg Francia, por Aleil et al en el 2005 (3), se sugiere que el ensayo de la fosforilación 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 clínicos. Este rasgo marco la diferencia con otros estudios anteriores realizados en plaquetas y también mediante citometría de flujo, en los cuales es necesaria la obtención previa de plasma rico en plaquetas.

El uso de sangre total asegura que dicha sangre ha sido mínimamente manipulada, lo que elimina totalmente la posibilidad de activación plaquetaria debida a centrifugación. Otro estudio realizado por Bonello y cols. en 2008 (1), destaca la importancia de que la técnica de fosforilación de VASP por Citometría de Flujo, es capaz de medir de manera individual la inhibición del receptor P2Y₁₂, el cual es el blanco o lugar de acción del Clopidogrel. Este estudio concluye que esta técnica es la más confiable en la monitorización de pacientes resistentes al tratamiento con Clopidogrel que pudieran requerir ajustes en las dosis de tratamiento.

De acuerdo a lo anterior, el índice de reactividad plaquetaria IRP, es una medida del porcentaje de reactividad plaquetaria, la cual es inversamente proporcional a la eficacia del Clopidogrel, es decir a mayores porcentajes de IRP, menor efectividad del Fármaco. En el estudio prospectivo realizado por Barragan y cols (51). Se observa una fuerte correlación entre la trombosis subaguda causada por la implantación del Stent y los IRP por arriba del 50%, estos resultados fueron confirmados mas tarde en un estudio prospectivo que demuestra un muy alto valor predictivo negativo de eventos cardio-cerebro vasculares mayores (MACCE) después de la ICP. El punto de corte más estricto respecto a la buena respuesta al Clopidogrel, es el establecido por Siller y Matula en 2008 (52) y corresponde al 69%. En nuestro estudio las medias de los IRP no mostraron una diferencia significativa antes y después del cateterismo cardiaco probablemente debido al número de la muestra, sin embargo, observamos que en la muestra de 24 horas posteriores al cateterismo, un número mayor de pacientes (19.04%) presentaba IRP superiores al punto de corte establecido por Siller y Matula, lo que permite clasificarlos como bajos respondedores al Clopidogrel.

La media del IRP de los tres grupos (basal, 24 horas y 1 mes), están por debajo del punto de corte establecido para buenos respondedores al tratamiento con Clopidogrel. Sin embargo en los tres grupos se encontraron pacientes que se encontraban por encima del punto de corte recomendado como se puede observar en la siguiente grafica de dispersión de puntos.

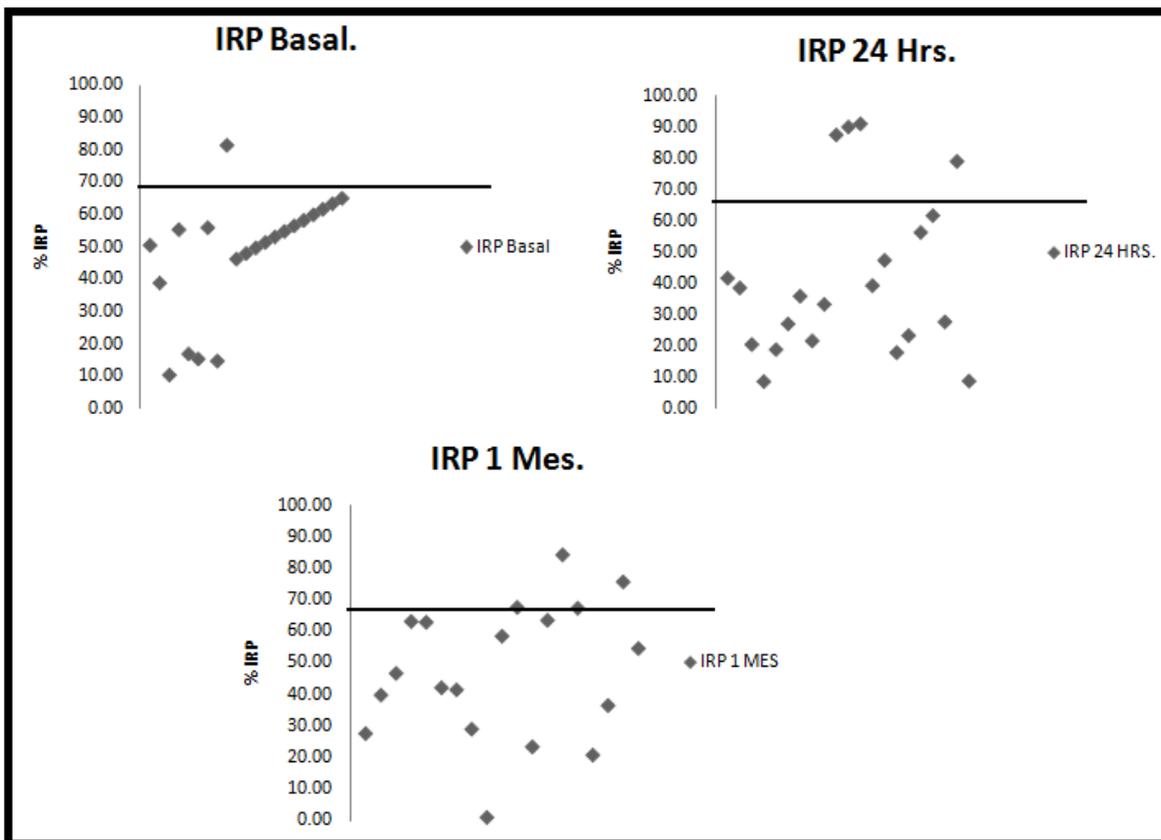


Grafico 5. IRP mostrados por los pacientes del estudio.

En el grafico 5 se puede observar como en los IRP basales solo 1(4.76%) de los pacientes estuvo por encima del punto de corte, mientras que a las 24 horas el número de pacientes que rebasaron el punto de corte fue de 4 (19.04%), los IRP al mes mostraron 2 pacientes (10.52%) por encima del punto establecido (52). Sin embargo, los resultados anteriores podrían variar sustancialmente si dicho punto de corte fuera modificado. El punto de corte que separa la buena respuesta a la baja respuesta al Clopidogrel es motivo de muy amplia controversia y la literatura resulta confusa en este aspecto. El estudio realizado por Barragan P et al en el 2003 (51) establece el punto de corte $< 50\%$ para buenos respondedores al tratamiento con Clopidogrel, mas tarde en el 2008 el grupo francés de Bonello y cols (1), establece de nuevo este punto de corte $< 50\%$ para buenos respondedores y $> 50\%$ para los sujetos que no responden al tratamiento. Sin embargo al comparar la técnica del VASP/P2Y₁₂ con la agregometría plaquetaria que es considerado el estándar de oro para determinar el estado de agregación de las plaquetas, observaron que los pacientes que fueron definidos mediante el uso de esta técnica como bajos respondedores al tratamiento con Clopidogrel, mediante la técnica del VASP/P2Y₁₂ podían ser clasificados como no respondedores al tratamiento con Clopidogrel usando el punto de corte $<50\%$. Más tarde en el mismo año Siller-Matula y cols, utilizando criterios más estrictos establecieron el punto de corte $<69\%$ para buenos respondedores. En el presente estudio se utilizo el punto de corte establecido por este grupo, tratando evitar una errónea clasificación de los pacientes como no respondedores, la cual no fuera consensual ni equiparable con los estudios ya realizados en otros países o con otras técnicas ya establecidas tales como la agregometría.

Otro de los propósitos de nuestro trabajo fue estudiar el efecto de la dosis de carga de 600 mg de Clopidogrel, como tratamiento preventivo de eventos trombóticos después de la ICP. En la actualidad en la práctica clínica común está indicado el pre-tratamiento con dosis de carga de 300mg de Clopidogrel 6 horas previas a la ICP. En un estudio de prevalencia de la resistencia al Clopidogrel después del estándar de 300mg de Clopidogrel como dosis de carga se obtuvieron IRP de 75%, sin embargo, las dosis de carga de 600 mg fueron asociadas con un más rápido y mejor efecto antiplaquetario, además de que se observó una reducción en el porcentaje de pacientes que presentaban resistencia al fármaco (53,54), otros estudios también sugieren que las dosis de carga de 600mg de Clopidogrel comparadas con las de 300 mg conducen a un mejor efecto antiplaquetario sin riesgos hemorrágicos (55). En el presente estudio se utilizó con éxito la dosis de carga de 600 mg, no se presentó ningún dato de complicación hemorrágica ni efecto secundario adverso a la dosis del medicamento.

En las últimas décadas, existe un profundo interés en la búsqueda de biomarcadores diagnósticos y pronósticos que puedan ser identificados en sangre de pacientes con enfermedad cardiovascular, con el fin de ayudar a identificar pacientes que pudieran desarrollar eventos cardiovasculares adversos.

El FvW es un biomarcador bien caracterizado de riesgo cardiovascular y sus niveles incrementados en pacientes con síndromes coronarios agudos (SCA) (58). Boneau y colaboradores (59) fueron los primeros en proponer la medición plasmática de FvW como indicador de daño endotelial en enfermedad cardiovascular. El estudio realizado por Spiel A y cols. en el 2008 (60), sugiere que existe una fuerte correlación entre elevadas concentraciones de FvW plasmático y la incidencia y pronóstico de SCA, también sugieren que son debido a la función que desempeña el FvW en la formación de trombos coronarios y la disfunción de la microcirculación de estos pacientes.

En nuestro estudio uno de nuestros objetivos particulares fue determinar las concentraciones plasmáticas del FvW, en las muestras basales, 24 horas y un mes posterior a la angiografía y/o ICP. Comparamos las medias de las muestras Basales, 24 horas y un mes post angiografía y/o ICP con las concentraciones de FvW de sujetos sanos, encontramos que los pacientes presentaron niveles muy elevados del FvW, con diferencias significativas al comparar las concentraciones de muestras basales con las de sujetos sanos ($p=0.001$); muestras 24 horas con las de sujetos sanos ($p=0.001$) y muestras al mes con las de sujetos sanos ($p=0.001$). Es importante destacar que se encontraron concentraciones plasmáticas del FvW elevadas en estos pacientes a pesar del tratamiento antiplaquetario. Lo cual puede explicarse ya que, el FvW es un mediador de adhesión y agregación plaquetaria, lo cual puede llevar a cabo a través de su unión con receptores plaquetarios tales como la glicoproteína Ib-V-IX y glicoproteína IIb-IIIa.

El Clopidogrel actúa sobre las plaquetas inhibiéndolas, por mecanismos específicos que involucran a la receptores plaquetarios específicos tales como P2Y₁₂ y la glicoproteína IIb-IIIa, sin embargo el FvW ejerce también su función a través de su unión al complejo Ib-V-IX, el cual no se ve afectado por la mecanismo de acción del Clopidogrel. Además como pudo observarse durante nuestro estudio en algunos pacientes no se logro una inhibición total de plaquetas y por lo tanto la producción y acción del FvW continúa efectuándose.

No encontramos diferencias significativas en la concentración del FvW en las diferentes muestras al comparar el grupo de pacientes sometidos a ICP y el grupo control. Esto puede explicarse por el estado de sangre vulnerable que presentan los pacientes tanto con angiografía diagnóstica como los sometidos a ICP con implantación de STENT, estado descrito por Badimon JJ en el 2007 (56) y el cual es inherente a la patología cardiovascular, independientemente de la implantación o no de STENT.

Realizamos también la determinación de la concentración de P-Selectina soluble en el plasma de los pacientes incluidos en este estudio. Esta determinación se llevo a cabo en las muestras basales, 24 horas y un mes posterior a la Angiografía y/o ICP. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio, sin embargo si se encontraron diferencias en los niveles de P-Selectina soluble de pacientes al compararlos con los niveles obtenidos en sujetos sanos. La diferencia fue de $p=0.012$ para la muestra basal; P-Selectina soluble de 24 horas con P-Selectina de sujetos sanos encontrando una $p= 0.022$ y P-Selectina al mes con P-Selectina de sujetos sanos, cuya resultado de p no alcanza una diferencia significativa, obteniendo una $p=0.097$, lo cual pone en evidencia que los niveles de P-Selectina soluble al mes se recuperan o estabilizan, debido al efecto antiplaquetario que el Clopidogrel logra sobre la expresión de P-Selectina al mes.

El artículo de Revisión realizado por Andrew D y cols en el 2003 (61) el cual fue publicado por la sociedad Europea de Cardiología señala que la P-Selectina es una molécula de gran interés debido a la función que esta desempeña modulando la interacción entre las células de las sangre y el endotelio vascular, además su forma soluble ha sido usada con un predictor de Eventos cardio-cerebro vasculares Mayores. Además señala que los niveles incrementados de P-Selectina soluble en el plasma han sido demostrados también en una variedad de desordenes cardiovasculares, incluyendo la enfermedad arterial coronaria, hipertensión Arterial y fibrilación Auricular.

En el presente estudio se obtuvieron también resultados interesantes al relacionar los niveles de P-Selectina Basal, 24 Horas y un mes con los pacientes que presentaban Hipertensión Arterial. Encontrando deferencias estadísticamente significativas, ya que los niveles plasmáticos de P-Selectina soluble basal ($p=0.033$) y P-Selectina soluble a las 24 horas ($p=0.039$) se encontraron incrementados en los pacientes hipertensos en comparación de los pacientes que no presentaban hipertensión Arterial.

Lo anterior puede atribuirse a la fuerza de cizalladura aumentada de la sangre (high shear stress) que presentan los pacientes hipertensos lo cual puede contribuir a la disrupción del endotelio y esto a su vez a la activación de las plaquetas, las cuales como resultado de lo anterior expresaran mayor cantidad de P-Selectina en sus superficies.

Observamos también un incremento en los niveles de P-Selectina soluble en la muestra basal de pacientes que sufrieron Complicaciones tales como eventos cardio cerebro vasculares mayores (MACCE), lo cual puede sugerir a la P-Selectina soluble como un biomarcador predictivo de eventos cardiovasculares mayores, sin embargo el número de pacientes incluidos en este estudio es pequeño, pero este hallazgo podría ser un indicio para que estudios multicentricos evaluaran los niveles de P-Selectina soluble en sus poblaciones de estudio.

Es importante destacar que este hallazgo es el primero reportado en América ya que la relación de P-Selectina soluble y MACCE solo había sido reportada en la unión europea (61)

9. CONCLUSIONES.

- Encontramos claras diferencias de efectividad en la respuesta al tratamiento con Clopidogrel
- La prueba de fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores VASP es una prueba confiable para efectuar ajustes en las dosis de carga y mantenimiento de pacientes con ICP.
- Se obtuvo una buena respuesta antiplaquetaria con dosis de 600mg de Clopidogrel, sin complicaciones hemorrágicas.
- Se encontraron niveles incrementados de FvW, a pesar del tratamiento antiplaquetario al que estuvo sometida nuestra población de estudio.

- Encontramos niveles incrementados de P-selectina soluble, sin embargo estos niveles no se presentaron tan elevados como en el FVW.
- Los pacientes hipertensos presentan niveles incrementados de P-selectina soluble.
- La P-selectina soluble podría ser un biomarcador predictivo de Eventos Cardio-cerebro vasculares mayores.

10. REFERENCIAS.

1. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S. Adjusted Clopidogrel Loading Doses According to Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Phosphorylation Index Decrease Rate of Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With Clopidogrel Resistance: A Multicenter Randomized Prospective Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51; 1404-1411.
2. Angiolillo D. Pruebas de función plaquetaria en la práctica clínica: ¿estamos preparados para que pasen a la primera línea?. *Rev Esp Cardiol.* 2009; 62(2):113-6.
3. Aleil B , Ravanat C, Cazenave J. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 85–92.
4. Ross R. Cell Biology of atherosclerosis. *Ann Rev Physiol* 1995; 57:791-804.
5. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *New Eng J Med* 1992; 326:242-250 y 310-318.
6. Murray CJ, Lopez AD: Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 1349 (9061): 1269-1276.

7. Ware JA, Heistad DD: Platelet-Endothelium interactions. *New Engl J Med* 1993; 328: 628-35.
8. Fischer A, Gutstein DE, Fuster V. Thrombosis and coagulation abnormalities in the acute coronary syndromes. *Cardiol Clin* 1999; 17(2):283-294.
9. Falk E, Fernandez-Ortiz A. Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J cardiol* 1995; 75:5B-11B.
10. Badimon L, Vilahur G. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(10):1161-78
11. Barrabes J, Sanchís J. Actualización en cardiopatía isquémica. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(Supl 1):80-91
12. Fuster Valentin, Corti Roberto. Nuevos Conceptos de la Aterotrombosis. *Ann NY Acad Sci* 2001;997.
13. Morgorster E. Human platelet morphology/ultrastructure. In von Bruchhausen F, Walter U (Eds). *Handbook of experimental pharmacology*, vol 126. Platelets and their factors. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1997:28-60.
14. Klinger MHF. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. *Ann Hematol* 1996; 76:103-12.
15. García- Meza M, Alfonso CC. Características Funcionales y Estructurales de las plaquetas. *Rev. Cubana Angiol y Cir Vasc* 2000; 1:132-4.
16. Fuster JH, Badimon L, Badimon J, Chessebro JH. The role of platelets, thrombin and hiperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J. Am Coll Cardiol* 1992; 17:77B-88B.
17. Casscells W. Migration of smooth muscle cells and endothelial cells: critical events in restenosis. *Circulation* 1992; 86:723-729.
18. Schmitz G. et al. European working group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelets function. *Throm Haemost*. 1998; 79:885-896.

- 19.Theoux P. Platelets function and monitoring with long-term inhibition of the glycoprotein IIb/IIIa receptor with oral antagonist. *Am Heart J*.1998; 135:S107-S200.
- 20.Ikeda Y, Murata M,Goto S.Von Willebrand Factor-Depend shear induced platelets aggregation. Basic mechanism and clinical implications. *Ann NY Acad Sci* 1997.
- 21.Boos CJ, Blann AD, Lip GYH. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J am Coll cardiol* 2006; 48:1538-1547.
- 22.Christopher J, Boss MD, Balakrishnan B, Blann AD. Effects of percutaneous coronary intervention of peripheral venous blood Circulating Endothelial Damage/Disfunction. *CHEST* 2007; 132:1920-1926.
- 23.Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T et al. Release of endothelin 1 and angiotensin II induced by percutaneous trasluminal coronary angioplasty. *Cathet Cardiovascular Int* 51:42-49, 2000.
- 24.Herper G, Murat N, Durmaz T, Kalkan F. Prosctive Evaluation of Von Willebrand Factor After Multiple and Single Stenting. *Angiology* 55:177-186, 2004.
- 25.Michelson AD. P2Y12 Antagonism Promises and Challenge. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*.2008; 28:33-38.
- 26.Dominick JA, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, et al. Variability in individual responsiveness to copidrogel. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1505-16.
- 27.Steinhubl SR, Charningo R, Moliterno DJ. Resistance to antiplatelet resistance is it justified?. *J Am Coll Cardiol*.2005; 45:1757-1758.
- 28.Popma JJ,Berger P,Ohman ME,Harrington RA. Antithrombotic therapy during Percuetaneous Coronary Intervention. *CHEST* 2004; 126:576S-599S.
- 29.Leopold JA, Antman EM. Dual Antiplatelet therapy for coronary Stenting. *Circulation* 2005; 111:1097-1099.

30. Caunedo-Almagro Patricia. La citometría de flujo en el estudio de las plaquetas. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2004; 20(1).
31. Monteiro MC, Martínez M, O'Connor JE. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. *Rev. Diagn Biol.* 2002; 51(3): 87-99.
32. Kauffenstein G, Bergmeier W, Eckly A, Ohlmann P, Leon C, Cazenave JP, Nieswandt B, Gachet C. The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin—a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett* 2001; 505: 281–90.
33. Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Herbert JM, Walter U. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2007–11.
34. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry 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: 1145–52.
35. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, Macaluso G, Commeau P, Comet B, Lafont A, Camoin L, Walter U, Eigenthaler M. Resistance to thienopyridines: Clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003; 59: 295–302.
36. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
37. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105; 1135-43.

38. Fuster V, Gotto AM, Libby P, Loscalzo J, McGill HC. Matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Pathogenesis of coronary disease: the biologic role of risk factors. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:964-76
39. Burke AP, Farb A, Malcolm GT, Liang YH, Smialek J, Vimani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997;336:1276-81.
40. Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, et al. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 2003;107:973-7.
41. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxid: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
42. Brand K, Page S, Rogler G, Barstch A, Brandl R, Knuechel R, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97:1715-22.
43. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997; 96:4219-25.
44. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. 2001; 103:491-5.
45. Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B. Von Willebrand Factor in Cardiovascular Disease Focus on Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2008; 117:1449-1459.)
46. Herper G, Murat N, Durmaz T, Kalkan F. Prospective Evaluation of Von Willebrand Factor After Multiple and Single Stenting. *Angiology* 55:177-186, 2004.

47. Kamath S, Blann AD, Chin BSP et al. A prospective randomised 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;40:484–90.
48. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. 2003 The European Society of Cardiology. Published by Elsevier Ltd. 2003.08.021.
49. Gurbel PA, Bliden KP, Tantry US. Evidence that pre-existent variability in platelet response to ADP accounts for 'clopidogrel resistance': a rebuttal. *J Thromb Haemost.* 5:1087-88, 2007.
50. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry 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;82:1145–52.
51. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;59:295–302.
52. Siller-Matula JM, Panzer S, Jilma B. Reproducibility and standardised reporting of the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay. *Platelets* 2008; 19:551-4.
53. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. High Clopidogrel loading dose during coronary stenting: effects on drug response and interindividual variability. *Eur Heart J* 2004; 25:1903–10.
54. Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high

- post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1392– 6.
55. Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. Benefit of a 600-mg loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1339–45.
56. Badimon JJ, Fuster V. Papel de los factores de riesgo en la trombogenicidad sanguínea y los síndromes coronarios agudos.
57. Mak KH, Moliterno DJ, Granger CB, Miller DP, White HD, Wilcox RG, et al. Influence of diabetes mellitus on clinical outcome in the thrombolytic era of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:171-9.
58. Lip GY. Assessment of endothelial damage and dysfunction: observation in relation to heart failure. *QJM* 2003;42:1149-1160.
59. Boneau B, Abbal M, Plante J, Bierne R. Factor VIII complex and endothelial damage. *Lancet* 1975;1:1430.
60. Spiel A, Gilbert J, Von Willebrand Factor in Cardiovascular Disease Focus on Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2008; 117:1449-1459.)
61. Blann A, Nadar S K, The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *ehj*.2003.08.021