



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

TESIS

***“VALIDACION DE METODOLOGIA MEDIANTE USO DE DISPOSITIVO A PIE
DE CAMA PARA LA EVALUACION DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA EN
PACIENTES SOMETIDOS A TERAPIA ANTIPLAQUETARIA”***

PARA OBTENER EL GRADO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

P. QFB NALLELY ITANDEHUI GARCIA LARRAGOITI

ASESOR DE TESIS

D.C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

CO ASESOR DE TESIS

DR. CARLOS ARTURO AREAN MARTINEZ

MORELIA MICHOACÁN OCTUBRE DEL 2012



El presente trabajo se realizo en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la División de estudios de Posgrado de la facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en colaboración con la Unidad de Hemodinamia del servicio de Cardiología y la Unidad de Investigación “Mario Alvizouri Muñoz”, del Hospital General “Dr. Miguel Silva” en la ciudad de Morelia Michoacán.

Se conto con el apoyo del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE/CONACYT 2010 al proyecto “Estudio de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) para la evaluación de reactividad plaquetaria y resistencia al Clopidogrel en pacientes con enfermedad cardiovascular isquémica sometidos a intervención coronaria percutánea” con número 142034.

DEDICATORIAS

A Dios.

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

A mis padres.

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

A mis hermanos

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

A mis abuelitos

Por brindarme siempre su cariño, sus sabios consejos, por ser el pilar de mi hermosa familia, por su apoyo incondicional, por los ejemplos de perseverancia y constancia.

A mis Tías

Tere, Oliva y Chelo por que más que mis tías han sido como mis madres, por sus palabras de aliento, su apoyo, por el cariño que siempre me han brindado, por sus consejos que me han impulsado a ir siempre hacia adelante.

A toda mi familia

A todos ustedes por estar conmigo en las buenas y en las malas, por darme toda una vida llena de cariño e impulsarme siempre a mejorar.

A mi mejor amigo.

Polo por compartir y apoyarme en todo momento incondicionalmente, por cuidarme y defenderme, por tus consejos, por estar a mi lado en esta bonita etapa que fue la universidad, por no dejarme caer.

AGRADECIMIENTOS

A la D.C. Martha Eva Viveros Sandoval

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

Al Dr. Carlos Arturo Areán Martínez

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

A la M.C. Guadalupe Gissela Marín Hernández

Por orientarme en un momento de indecisión, por confiar en mí para realizar este trabajo, por sus consejos y su gran calidad humana y profesional.

Al D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos y a la Q.F.B. Virginia Campos Cabrera

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

Al Matemático Carlos Gómez Alonso

Por su valiosa aportación a la parte estadística de este trabajo

Al área de hemodinamia del Hospital General “Dr. Miguel Silva”

Al Dr., Rubén Solorio, Nora, Claudia Y Elvira por su apoyo durante este trabajo en el reclutamiento de pacientes, por las facilidades brindadas.

A mis compañeros del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular

MC. Alejandra Taboada, MC. José Juan Soto, LN. Carolina Torres, por sus valiosas enseñanzas, consejos y buenos deseos pero sobre todo por la amistad que me brindaron en todo momento.

A la UMSNH y especialmente a la Facultad de Químico Farmacobiología

Por ser mi casa durante todo este tiempo y darme todas las facilidades para crecer como persona y como profesionalista.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIAS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE	V
INDICE DE TABLAS.....	VIII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS	X
GLOSARIO.	XI
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. MARCO TEÓRICO	6
4.1.ORIGEN Y ESTRUCTURA PLAQUETARIA	6
4.1.1 LAS PLAQUETAS Y SU PAPEL EN LA HEMOSTASIA.....	9
4.1.2.ADHESIÓN PLAQUETARIA.	10
4.1.3 SECRECIÓN PLAQUETARIA (PROCESO DE LIBERACIÓN).....	11
4.1.4 AGREGACIÓN.....	11
4.2 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA.....	12
4.2.1 AGREGOMETRÍA.....	12
4.2.2 CITOMETRÍA DE FLUJO	13
4.2.3 ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS PLAQUETARIAS.....	14
4.2.4 ANÁLISIS VASP	15
4.3 DISPOSITIVOS DE USO INMEDIATO.....	17
4.3.1 PFA-100	17
4.3.2 VERIFYNOW	18

4.4 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y ANGIOPLASTIA CORONARIA.....	20
4.5 TERAPIA ANTIPLAQUETARIA	21
4.5.1 ASPIRINA.....	22
4.5.2 CLOPIDOGREL.....	23
4.5.3 PRASUGREL.....	25
5. JUSTIFICACIÓN.....	27
6. HIPÓTESIS.....	27
7. OBJETIVOS.....	28
7.1 OBJETIVO GENERAL.	28
7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.	28
8. CRITERIOS.....	29
8.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.	29
8.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.	29
8.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.	29
9. MATERIAL Y MÉTODOS	30
9.1 SITIO DE ESTUDIO.	30
9.2 TIPO DE ESTUDIO	30
9.3 SELECCIÓN DE LA MUESTRA.	30
9.4 TOMA DE MUESTRA.....	31
9.5 METODOLOGÍA	31
9.5.1 TÉCNICA DE FOSFORILACIÓN DE LA FOSFOPROTEÍNA ESTIMULADA POR VASODILATADORES VASP POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	31
9.5.2 PREPARACION DE LOS TUBOS Y DE LA MUESTRA.....	32
9.5.3 ANALISIS. ADQUISICIÓN DE PLAQUETAS POR CITOMETRIA DE FLUJO	33
9.5.4 FORMULA GENERAL PARA LA DETERMINACION DEL INDICE DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA.....	34
9.5.5 ANALISIS. ADQUISICIÓN DE PLAQUETAS POR ENSAYO VERIFYNOW P2Y ₁₂	34
10. ANALISIS ESTADISTICO.....	37

11.	RESULTADOS	38
12.	DISCUSION.....	53
13.	RESUMEN DE RESULTADOS	61
14.	CONCLUSION	62
15.	PERSPECTIVAS	63
16.	REFERENCIAS.....	64
17.	ANEXOS	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Productos liberados por gránulos de plaquetas.....</i>	9
Tabla 2. <i>Anticuerpos monoclonales cuantificables por citometría de flujo.....</i>	14
Tabla 3. <i>Puntos de corte sugeridos para VASP-IRP medido por citometría de flujo.....</i>	16
Tabla 4. <i>Puntos de corte sugeridos por diferentes grupos de trabajo para las unidades de reacción P2Y12 (PRU) medido por VerifyNow.....</i>	19
Tabla 5. <i>Preparación de los tubos y de la muestra para análisis VASP.....</i>	32
Tabla 6. <i>Características demográficas y clínicas de la población de estudio.....</i>	38
Tabla 7. <i>Correlación de Pearson para las variables cuantitativas IRP-VASP y PRU-INHIBICION-VerifyNow.....</i>	39
Tabla 8. <i>Estadísticos descriptivos IRP toma post carga y 24 horas.....</i>	42
Tabla 9. <i>Estadísticos descriptivos PRU toma post carga y 24 horas.....</i>	44
Tabla 10. <i>Comparación del IRP, PRU TPC y del IRP, PRU T24 de acuerdo al genero.....</i>	45
Tabla 11. <i>Correlación del IRP y PRU toma post carga con los datos clínicos y demográficos de la población de estudio.....</i>	46
Tabla 12. <i>Correlación del IRP y PRU toma 24 horas con los datos clínicos y demográficos de la población de estudio.....</i>	47
Tabla 13. <i>Comparación de los datos de laboratorio contra IRP y PRU TPC.....</i>	48
Tabla 14. <i>Distribución individual en cuartiles de la respuesta a Clopidogrel mediante el IRP TPC medido por VASP.....</i>	49
Tabla 15. <i>Distribución individual de la respuesta a Clopidogrel con un punto de corte del IRP-VASP TPC de 69%.....</i>	50
Tabla 16. <i>Distribución individual de la respuesta a Clopidogrel mediante PRU medido por VerifyNow.....</i>	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Etapas clave en la megacariopoiesis</i>	7
Figura 2. <i>Angioplastia con implantación de endoprótesis vascular (stent)</i>	21
Figura 3. <i>Mecanismo de acción del Clopidogrel</i>	23
Figura 4. <i>Posibles mecanismos involucrados en la variabilidad de respuesta al clopidogrel</i>	24
Figura 5. <i>Vías metabólicas para la biotransformación de Prasugrel y Clopidogrel a metabolitos activos</i>	26
Figura 6. <i>Correlación del IRP-VASP y PRU-VerifyNow</i>	40
Figura 7. <i>Correlación PRU e Inhibición</i>	41
Figura 8. <i>Determinación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la evaluación del IRP toma post carga a las 24 horas de su administración</i>	43
Figura 9. <i>Determinación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la evaluación del PRU toma post carga a las 24 horas de su administración</i>	44
Figura 10. <i>Distribución y variabilidad individual de índice de reactividad plaquetaria (IRP) medido por VASP en cuartiles</i>	49
Figura 11. <i>Distribución y variabilidad individual de índice de reactividad plaquetaria (IRP) medido por VASP con punto de corte del 69%</i>	50
Figura 12. <i>Distribución y variabilidad individual de las Unidades de reacción P2Y₁₂ medido por VerifyNow Utilizando un punto de corte de >230 para pacientes no respondedores al tratamiento con Clopidogrel</i>	52

ABREVIATURAS

ADP. Adenosin difosfato de Sodio.

AMPc. Adenosin monofosfato cíclico.

CAD. Enfermedad arterial coronaria (Coronary artery disease).

CMF. Citometría de flujo.

COX-1. Cicloxigenasa 1

ECV. Enfermedad cardiovascular.

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

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

IAM. Infarto agudo al miocardio.

ICP. Intervención Coronaria Percutánea.

MFIc. Índice medio de fluorescencia corregido.

PGE1. Prostaglandina E1.

PRP. Plasma rico en plaquetas.

PRU. Unidades de reacción P2Y₁₂.

IRP. Índice de reactividad plaquetaria.

SCA. Síndrome Coronario Agudo.

TAX₂. Tromboxano A₂.

VASP. Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.

GLOSARIO.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trombocitopenia. Nivel anormalmente bajo de plaquetas en la sangre.

Trombopoyesis. Proceso de formación de nuevas plaquetas o trombocitos.

1. RESUMEN

Antecedentes. La función plaquetaria y su homeostasis resultan clave en padecimientos cardiovasculares, por lo que el uso de medicamentos antiplaquetarios está ampliamente difundido. La inhibición del receptor plaquetario $P2Y_{12}$ mediante la administración de Clopidogrel y Prasugrel ha representado un importante avance en el tratamiento farmacológico de los pacientes con enfermedad aterotrombótica, especialmente en los síndromes coronarios agudos y en el intervencionismo coronario percutáneo. Los métodos mediante los cuales podemos conocer el grado de inhibición de la función plaquetaria se han modificado en los últimos años, sin embargo no existe un consenso acerca del método ideal para cuantificar dicha inhibición. Los ensayos, que podrían ser considerados el estándar de oro, como la agregometría plaquetaria y técnicas novedosas como la citometría de flujo son técnicas complejas y restringidas a laboratorios especializados y/o de investigación y por lo tanto resultan poco útiles en la práctica clínica rutinaria. Así pues, existe la necesidad de un ensayo fiable de respuesta rápida la cual se pueda realizar directamente en el laboratorio antes de una intervención coronaria. Por otro lado, la exactitud de los dispositivos rápidos todavía no está clara. La prueba Verify Now $P2Y_{12}$ está diseñada para superar las limitaciones de ensayos ópticos de agregación de plaquetas y se encuentra entre los llamados “dispositivos a pie de cama” dada la rapidez con la cual se pueden obtener los resultados. Sin embargo, existen pocos datos clínicos que correlacionen este dispositivo con ensayos especializados.

Objetivos. Comparar la metodología de análisis VASP por citometría de flujo y el uso de un dispositivo de uso inmediato: Verify Now para el monitoreo clínico de antiplaquetarios orales.

Métodos. Estudio experimental, prolectivo, longitudinal. Se incluyeron muestras de pacientes que ingresaron a la sala de hemodinamia para angiografía diagnóstica y/o angioplastia coronaria, y que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos, entre los cuales se encuentra el haber recibido una dosis de carga de 600 mg del antiplaquetario Clopidogrel de 6 a 8 horas previas a la toma de muestra. Se determinó el índice de Reactividad Plaquetaria por ensayo VASP- $P2Y_{12}$ y citometría de flujo y las Unidades de Reactividad Plaquetaria mediante ensayo Verify Now $P2Y_{12}$.

en dos muestras en cada paciente: Muestra 1: 6-8 horas post-carga de Clopidogrel y muestra 2: 24 horas después del procedimiento angiográfico.

Resultados. 30 pacientes: 26 hombres (86.6%) y 4 mujeres (13.4%), con edad promedio de 60.5 ± 11.18 años. A 16 pacientes (58.3%) se les realizó angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) y a los 14 restantes (38.9%) coronariografía diagnóstica. Se encontró una media de los valores del Índice de reactividad plaquetaria (IRP) en la toma post carga de 61.28 ± 22.83 y de 165.56 ± 89.20 para las Unidades de reacción $P2Y_{12}$ (PRU). Se realizó un análisis de correlación entre PRU-VerifyNow y el IRP-VASP de acuerdo a la prueba de Pearson en el cual se encontró una correlación entre ambas de 0.774. Los pacientes fueron estratificados en cuartiles de acuerdo al porcentaje de IRP, se sugirió una clasificación en la que un IRP $<50\%$ correspondía a pacientes con buena respuesta al Clopidogrel, un IRP $>50\%$ pero menor de 69% se consideraron pacientes con alta reactividad plaquetaria en tratamiento (ARPET) y aquellos pacientes con un IRP $>69\%$ fueron clasificados como «no respondedores» al antiplaquetario. Se tomó un PRU >230 para la identificación de pacientes «no respondedores» al tratamiento con Clopidogrel.

Conclusiones. Se observó una buena correlación entre PRU-VerifyNow y el IRP-VASP. La frecuencia total de la resistencia a clopidogrel fue del 40.0% en VASP-IRP y el 33.3% en VerifyNow-PRU. El dispositivo VerifyNow es una prueba que permite estudiar la función plaquetaria a pie de cama, el alto grado de correlación observado proporciona una nueva alternativa, adecuada para poder guiar la terapia antiplaquetaria y poder definir un pronóstico de manera rápida y sencilla, sin embargo la determinación del IRP por el análisis VASP/ $P2Y_{12}$ permite la identificación de pacientes con ARPET proporcionando mayor confiabilidad en la monitorización de pacientes en tratamiento con Clopidogrel.

2. ABSTRACT

Introduction. Platelet function and homeostasis are key in cardiovascular disease, so the use of antiplatelet drugs is widespread. The platelet P2Y₁₂ receptor inhibition by Clopidogrel and Prasugrel has represented a major advance in the pharmacological treatment of patients with atherothrombotic disease, especially in acute coronary syndromes and percutaneous coronary interventions. The methods by which we can determine the degree of inhibition of platelet function have changed in recent years; however, the ideal method to quantify such inhibition has not yet been agreed. The tests, which could be considered the gold standard, as platelet aggregometry and novel techniques such as flow cytometry VASP phosphorylation techniques are complex and restricted to specialized laboratories and / or research and therefore are not very useful in routine clinical practice. Thus there is a need for a rapid response reliable assay which can be performed directly in the laboratory before coronary intervention. Moreover, the accuracy of the fast assays still unclear. Verify Now P2Y₁₂ the test is designed to overcome the limitations of optical tests of platelet aggregation and is among the so called "point of care" given the speed with which you can get the results. However, there are few clinical data to correlate this device with specialized tests.

Objectives. To compare flow cytometry VASP phosphorylation assay and point of care: VerifyNow System to evaluate response to antiplatelet treatment with Clopidogrel.

Methods. Study experimental, prospective, longitudinal. We included samples of patients admitted to the cath lab for diagnostic angiography and / or coronary angioplasty, and who met the inclusion criteria, among which is the receipt of a loading dose of 600 mg of Clopidogrel antiplatelet 6-8 hours prior to sampling. Was determined by platelet reactivity index VASP-P2Y₁₂ assay and flow cytometry and platelet reaction units Verify Now P2Y₁₂ assay using, in two samples from each patient: Sample 1: 6-8 hours post-Clopidogrel loading and sample 2 24 hours after the angiographic procedure.

Results. 30 patients: 26 men (86.6%) and 4 women (13.4%), mean age 60.5 ± 11.18 years. In 16 patients (58.3%) underwent percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) and the remaining 14 (38.9%) diagnostic coronary angiography. We found a mean value of platelet

reactivity index (PRI) in the post takes charge ± 61.28 165.56 ± 22.83 and 89.20 for $P2Y_{12}$ reaction units (PRU). We performed a correlation analysis between VerifyNow PRU-IRP-VASP and according to Pearson test which found a correlation between both of 0.774 . Patients were stratified into quartiles according to the percentage of IRP, suggested a classification in which an IRP $<50\%$ were patients with good response to clopidogrel, an IRP $> 50\%$ but less than 69% patients were considered high reactivity platelet treatment (ARPET) and IRP patients with $> 69\%$ were classified as patients with low platelet response. It took a PRU > 230 para identifying patients with low response to Clopidogrel.

Conclusions. Good correlation was observed between VerifyNow-PRU and IRP-VASP. The overall frequency of clopidogrel resistance was 40.0% in VASP-IRP and 33.3% by VerifyNow-PRU. The VerifyNow device is a test that can assess platelet function at the bedside, the high degree of correlation observed provides a new alternative, suitable for power to guide antiplatelet therapy and to define a forecast quickly and easily, however the determining the IRP by VASP/ $P2Y_{12}$ analysis allows the identification of patients with ARPET providing greater reliability in monitoring patients on Clopidogrel.

3. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas desempeñan un papel preponderante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares más comunes. Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud pública por su alta prevalencia y porque constituyen la principal causa de muerte de la población adulta en la mayoría de los países. La inhibición del receptor plaquetario 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).

A pesar de los efectos benéficos 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 es la amplia variabilidad existente en la respuesta inhibitoria plaquetaria.

La importancia de las funciones que desempeñan las plaquetas justifica que exista un interés creciente en el desarrollo de pruebas de laboratorio que permitan valorar su funcionalidad. Puesto que estas funciones son muy diversas, complejas y están influidas por múltiples variables, es muy difícil que una sola prueba sea capaz por sí misma de informar de todas las potenciales disfunciones de las plaquetas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 ORIGEN Y ESTRUCTURA PLAQUETARIA

Las plaquetas se originan en la medula ósea a partir de fragmentos de citoplasma de los megacariocitos, carecen de ADN, pero contienen ARN mensajero (ARNm) derivado de los megacariocitos y la maquinaria necesaria para la síntesis de las proteínas (4), tienen una vida media entre 7 y 10 días, periodo en el contribuyen a mantener la integridad del endotelio vascular. Son células anucleadas que circulan en sangre periférica, miden en promedio de 2 a 4 micras de diámetro y de 0.6 a 1.3 micras de grosor, poseen una carga eléctrica negativa en su superficie.

Su concentración normal en la sangre es de $150\ 450 \times 10^9/L$ y con los eritrocitos y leucocitos constituyen los elementos formes de la sangre. (6) De la cantidad total de plaquetas en el cuerpo, 70% se mantiene en circulación, mientras que el restante 30% permanece de manera transitoria pero constante en el bazo.

Su forma y tamaño pequeño permite que las plaquetas sean empujadas hacia los bordes de los vasos sanguíneos, colocándolas en una posición optima para la vigilancia constante de la integridad vascular. La superficie de las plaquetas tiene un aspecto liso, pero con aberturas de un sistema de canalizaciones membranosas que comunican a toda la plaqueta, semejando a una esponja.

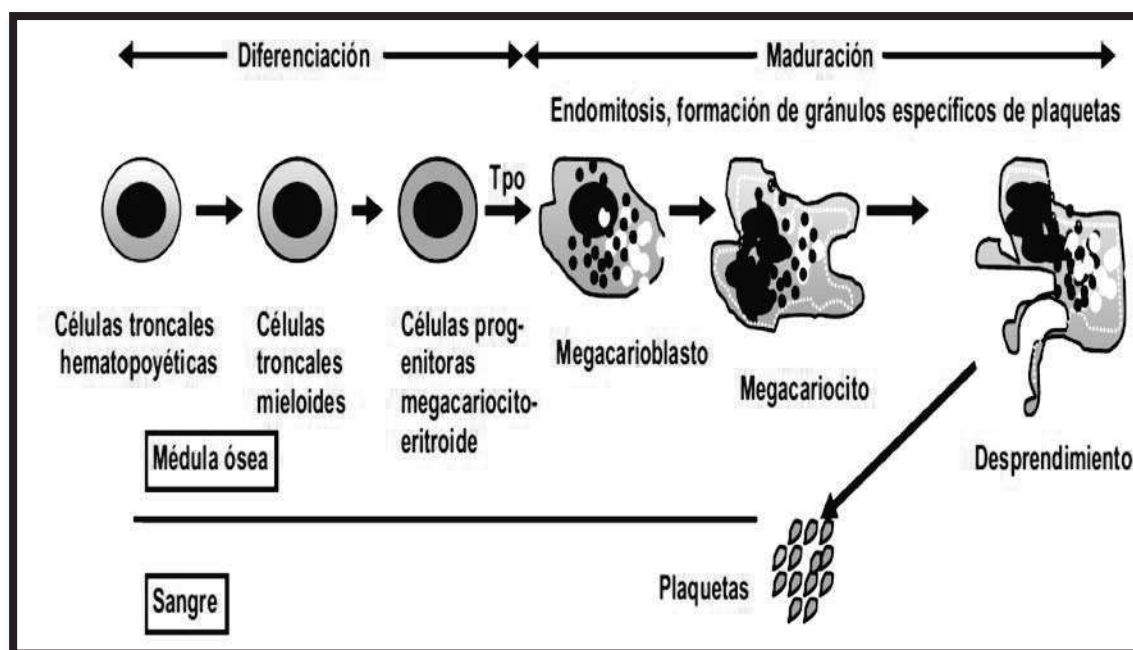


Figura 1. Etapas clave en la megacariopoyesis. Las células hematopoyéticas se diferencian en megacariocitos mediante la exposición al factor de crecimiento específico trombopoyetina. En la maduración de los megacariocitos tiene lugar un proceso de endomitosis. Los organelos citoplásmicos se organizan en dominios que representan a las plaquetas nacientes. La fragmentación del citoplasma megacariocítico en plaquetas individuales tiene lugar como resultado de la fuerza de cizallamiento de la sangre en circulación. Los organelos intracelulares se distribuyen dentro de la plaqueta en formación, a lo largo de circunferencias concéntricas de microtúbulos.

Las plaquetas poseen una estructura celular compleja y se dividen en tres zonas bien diferenciadas con actividades funcionales específicas: periférica, intermedia y de organelos (7).

La zona periférica representa la parte más externa de las plaquetas, constituye una de las partes fundamentales en los mecanismos de activación, adhesión y agregación plaquetaria y está formada por tres capas, la primera formada por glucoproteínas las cuales son

responsables de iniciar la respuesta plaquetaria a los estímulos externos a través de receptores específicos, una membrana plaquetaria constituida por una bicapa lipoprotéica con glucoproteínas que funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas, proteínas adhesivas y ligandos fibrosos como el colágeno, además posee enzimas importantes para el funcionamiento celular y fosfolípido; 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 las proteínas. La submembrana representa la capa mas interna aquí es donde se lleva a cabo la transformación de las señales recibidas en la membrana externa (4,7).

La zona intermedia se encuentra debajo de la zona periférica y constituye la estructura de la plaqueta. El citoesqueleto forma el sostén para el mantenimiento de la forma discoide de la plaqueta así como del sistema contráctil que, tras la activación, permite cambio de forma, prolongación pseudopódica, contracción interna y liberación de constituyentes granulares. El citoesqueleto comprende entre 30%-50% de la proteína total de la plaqueta (4,7).

La zona de organelos está formada por glucógeno, mitocondrias, gránulos densos, gránulos alfa y componentes celulares como lisosomas. Estos organelos sirven en los procesos metabólicos de la plaqueta y almacenan enzimas y otra gran variedad de sustancias, críticas para la función plaquetaria (4). Por otra parte en esta zona se encuentran también los denominados sistemas membranosos integrados por el sistema tubular denso, que funciona como un reservorio de calcio que es liberado al citoplasma por diferentes estímulos y el sistema canicular abierto el cual está conformado por una serie de canales interconectados y abiertos al exterior el cual permite la salida del contenido de los gránulos durante el proceso de secreción (4, 7).

Tabla 1. Productos liberados por los gránulos plaquetarios.

Gránulos alfa	Gránulos densos	Lisosomas
Fibrinógeno Fibronectina FvW Trombospondina Vitronectina Colagenasa Elastasa Inhibidores de proteasas PDGF TGF- β CTAP-111 PDECGF PAF Integrina α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) Factor 4 plaquetario β - tromboglobulina P-selectina Factor V Factor XI Factor XIII CAMP Inhibidor C1 complemento Proteína S PAI-1	ATP ADP Serotonina Calcio Magnesio Epinefrina Norepinefrina Dopamina	β - Glucoranidasa Fosfatasa ácida Catepsina Proteínas lisosomales de membrana (LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3-CD63)

4.1.1 LAS PLAQUETAS Y SU PAPEL EN LA HEMOSTASIA

Las plaquetas desempeñan un papel central en la hemostasia, se trata de estructuras muy evolucionadas y constituyen un ejemplo de especialización por las funciones que desempeñan. La hemostasia normal es el resultado de un conjunto de procesos bien regulados que cumplen dos funciones importantes, la primera es mantener la sangre en

un estado líquido no coagulable en los vasos normales y la segunda inducir un tapón hemostático localizado y rápido en el lugar de la lesión vascular. Cuando ocurre una lesión endotelial inicial hay un breve periodo de vasoconstricción y se desencadena una serie de mecanismos cuya finalidad es obstruir la lesión a través de una serie de procesos que permiten la formación del tapón hemostático, el proceso de transformación de plaquetas inactivas en un tapón plaquetario bien formado ocurre a lo largo de un proceso continuo, pero puede dividirse en tres etapas: 1) adhesión y cambio de forma, 2) secreción (proceso de liberación) y 3) agregación (12).

4.1.2 ADHESIÓN PLAQUETARIA.

Cuando ocurre una lesión en la pared de un vaso, quedan expuestos productos subendoteliales altamente trombógenos y se genera una serie de mecanismos que favorecen la unión entre la plaqueta y la matriz extracelular (MEC). Un primer mecanismo es la atracción electrostática por la diferencia de cargas y posteriormente una atracción enzimática. El factor Von Willebrand (FVW) facilita la adhesión inicial al unirse al complejo glicoproteínico (GP) Ib/IX/V. Estas interacciones permiten que la velocidad de circulación de las plaquetas disminuya lo suficiente para que tengan lugar otras interacciones de unión en otros pares receptor-ligando, lo que produce una adhesión estática. En particular, la interacción inicial entre colágeno y GPVI induce un cambio conformacional (activación) en las integrinas de las plaquetas GPIIb/IIIa y GPIa/IIa (4,7). El FVW y el colágeno forman solidas uniones con GPIIb/IIIa y GPIa/IIa respectivamente, anclando a las plaquetas en su lugar. El reclutamiento de otras plaquetas ocurre por medio de una interacción plaqueta-plaqueta que es mediada principalmente a través del fibrinógeno y su receptor, GPIIb/IIIa (12).

4.1.3 SECRECIÓN PLAQUETARIA (PROCESO DE LIBERACIÓN)

Al activarse, las plaquetas sufren cambios morfológicos, la forma de las plaquetas cambia de un disco a una esfera que posteriormente emite múltiples extensiones pseudopoidales, las cuales incrementan la superficie de contacto intraplaquetario. Este proceso se inicia con la unión de los agonistas a los receptores de la superficie plaquetaria, y va seguido de una cascada de fosforilación de las proteínas intracelulares. La liberación del contenido de los gránulos densos es especialmente importante porque para la cascada de coagulación se necesita calcio, y porque el adenosindifosfato (ADP) es un potente mediador de la agregación plaquetaria. El ADP aumenta la liberación de más ADP por parte de otras plaquetas. Finalmente la activación de las plaquetas provoca la expresión en la superficie de un complejo de fosfolípidos, que proporcionan la nucleación crítica y los lugares de unión para el calcio y los factores de coagulación en la cascada de coagulación intrínseca (7,12).

4.1.4 AGREGACIÓN.

El ADP y el tromboxano $A_2(TxA_2)$ establecen una reacción auto catalítica, que conlleva a la formación de un agregado plaquetario en aumento, el tapón hemostático primario. En esta fase participa fundamentalmente la integrina $\alpha IIb\beta 3$ que desempeña un papel fundamental en la agregación plaquetaria al unirse al fibrinógeno y calcio lo que permite la unión con otras plaquetas, sin embargo en el interior de la plaqueta también se desarrollan complejas reacciones de activación que finalmente van a permitir la reacción de liberación de los gránulos intraplaquetarios que favorecen la agregación plaquetaria secundaria (7,12).

4.2 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Las alteraciones en la función plaquetaria están asociadas a condiciones patológicas que conllevan tanto a disfunciones tromboembólicas como hemorrágicas. Una activación plaquetaria excesiva causa trombosis, mientras que la activación insuficiente causa hemorragia. Por esta razón, los estudios de activación y reactividad plaquetaria son relevantes en el conocimiento de la fisiopatología de la hemostasia y en las estrategias terapéuticas. Los métodos de evaluación de la función plaquetaria son muy variados, entre los más utilizados se encuentran aquellos que se basan en la agregación plaquetaria.

4.2.1 AGREGOMETRÍA

La medición de la agregación de las plaquetas o agregometría plaquetaria fue descrita en 1962 por Born como una técnica para estimar la cinética de la agregación de las plaquetas por medio de turbidimetría (medición de la turbidez o densidad óptica) (2,11). El método se convirtió de manera rápida en el patrón de referencia para el estudio de la función plaquetaria. La utilidad de estos estudios es muy amplia; sin embargo, hay que destacar que los resultados no son específicos de algún trastorno en particular y que, por el contrario, puede haber sobreposición de entidades con un mismo patrón de agregación (3).

Por lo anterior, se requiere el conocimiento amplio de todas las variables que intervienen en el desarrollo de la prueba y los resultados posibles.

4.2.2 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (CMF) se inició en la década de los 60 como un importante avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas, es un método de análisis celular multiparamétrico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al inferir en una fuente de luz (15, 21). El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos lectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula, una de las características más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares como el tamaño, la forma y la complejidad.

La citometría de flujo en sangre total es una herramienta de laboratorio relativamente nueva por medio de la cual podemos medir la expresión de proteínas en la célula usando anticuerpos monoclonales. También ha sido usada para evaluar una amplia gama de características plaquetarias en estudios científicos y clínicos, estos incluyen múltiples técnicas para la evaluación de la activación y reactividad plaquetarias, medición de los efectos de agentes antiplaquetarios y monitoreo de la trombopoyesis (21).

Estas técnicas tienen la ventaja de usar sangre total y no están limitadas en caso de trombocitopenia, como lo están la mayoría de las demás pruebas de la función plaquetaria. En general, estas técnicas aun no se utilizan en la práctica médica de rutina, especialmente en el caso de la evaluación de plaquetas, pero si en la de otras células sanguíneas, por ejemplo, linfocitos o polimorfonucleares para el diagnóstico y seguimiento de Leucemias.

4.2.3 ANÁLISIS DE GLUCOPROTEÍNAS PLAQUETARIAS

Desde hace ya mucho tiempo la Citometría de Flujo se viene aplicando al estudio de las células sanguíneas. En la actualidad ha cobrado especial relevancia el estudio de las plaquetas. Si bien, en una primera instancia se ha reservado esta posibilidad a los laboratorios de investigación, hoy en día es factible aplicar estas técnicas para su utilidad clínica (16). Las plaquetas tienen ciertas características que las hacen susceptibles de estudio por medio de la Citometría de Flujo resultando de gran valor clínico en diferentes patologías. En los estudios de activación plaquetaria, los anticuerpos monoclonales se dirigen frente a glucoproteínas, que durante la activación modifican su expresión antigénica a nivel de la membrana plaquetaria, la Citometría de Flujo no solamente permite su detección, sino que además tiene algunas ventajas, ya que permite la identificación específica de las plaquetas, por lo cual la presencia de otras células no interfiere en los resultados. Por otro lado, la caracterización cuantitativa de las anomalías plaquetarias, permite el monitoreo de seguimiento durante la terapia antiplaquetaria (22).

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales cuantificables por Citometría de Flujo

Anticuerpo monoclonal	Estructura antigénica	Función
CD62P	P selectina	Activación plaquetaria
CD41	GPIIb	Agregación
CD61	GPIIIa	
PAC-1	GPIIb/GPIIIa de alta afinidad	Ambas estructuras conforman el receptor para el fibrinógeno
CD42a	GPIX	Adhesión
CD24b	GPIb α	
CD42c	GPIb β	Conformación del receptor del FVW
CD42d	GPV	
CD36	GPIV	Receptor para la trombospondina y el colágeno
CD63	GP53	Proteína lisosomal
CD51	RVN	Cadena "a" del receptor de vitronectina

4.2.4 ANÁLISIS VASP

La fosfoproteína estimulada por vasodilatadores VASP (Vasodilatador Stimulated Phosphoprotein) es una proteína plaquetaria intracelular que no está fosforilada en condiciones basales. La fosforilación del VASP está regulada por la vía del AMPc (Adenosin-monofosfato cíclico). Esta vía se activa por la acción de la PGE1 (Prostaglandina E1) y se inhibe por el ADP (Adenosin-difosfato) a través de los receptores P2Y₁₂.

En las condiciones de la prueba, la fosforilación del VASP se asocia a la inhibición del receptor P2Y₁₂, mientras que la forma del VASP no fosforilado se asocia al estado activo del receptor P2Y₁₂. Este análisis es de gran utilidad pues evidencia el efecto de las tienopiridinas, tales como Clopidogrel y Prasugrel así como para valorar los efectos in vitro de los antagonistas del receptor P2Y₁₂.

La citometría de flujo de la fosfoproteína activada por vasodilatadores (VASP-fosforilado) es un marcador específico de la actividad del receptor P2Y₁₂ y, por tanto, de la inhibición de la agregación plaquetaria mediada por el Clopidogrel; sin embargo este método es caro, requiere la preparación de la sangre, citometría de flujo y sobre todo, personal experimentado (20,23).

El índice de reactividad plaquetaria (IRP) se calcula a partir de las medias corregidas de fluorescencia (MFlc) de la muestra estudiada en presencia de PGE1 sola (PGE1) o de PGE1 + ADP obteniendo un resultado en una escala porcentual del 1 al 100, lo que nos permite clasificar a los pacientes como buenos o malos respondedores a la terapia antiplaquetaria con Clopidogrel (24).

Numerosos estudios han informado de «resistencia farmacológica» al Clopidogrel como un posible predictor de episodios trombóticos tras la Intervención Coronaria Percutánea (ICP), Barragán y colaboradores fueron los primeros en demostrar una asociación entre la reactividad plaquetaria post-tratamiento y la aparición de eventos trombóticos en un

estudio caso-control de pacientes con ICP. En el estudio realizado por Barragán un índice de reactividad plaquetaria (IRP) >50% medido por el ensayo VASP se asoció con riesgo de trombosis. Recientes estudios han observado el valor pronóstico del análisis de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores VASP, con un valor de corte óptimo para IRP-VASP entre el 48% y 53%, que es similar al umbral definido por Barragán y cols.

Tabla 3. Puntos de corte sugeridos por diferentes grupos de trabajo para VASP- IRP medido por citometría de flujo

ESTUDIO	PACIENTES	NUMERO DE PACIENTES	TRATAMIENTO	PUNTO DE CORTE
Barragan y cols. (2003)	ICP	46	250 mg Ticlopidina 75 mg Clopidogrel	> 50% VASP-IRP
Bonello y cols. (2007)	ICP/stent	144	300 mg/ Clopidogrel	>50%VASP- IRP
Blindt y cols (Blindt R, 2007)	Alto riesgo de trombosis del stent/ICP	99	75 mg Clopidogrel	> 48% VASP-IRP
Bonello y cols. (2008)	ICP/stent	162	600 mg Clopidogrel	>50%VASP- IRP
Guillaume Cayla y cols. (2008)	SCA	49	300 mg Clopidogrel 75 mg Clopidogrel	>70% VASP-IRP
Siller-Matula y cols (2008)	ICP	280	600 mg Clopidogrel 75 mg Clopidogrel	>69% VASP-IRP
Bonello y cols. (2009)	ICP/stent	214	600 mg Clopidogrel	>50% VASP-IRP
Thomas Gremmel y cols (2011)	HRPR	46	100 mg Aspirina 75 mg Clopidogrel	> 50% VASP-IRP
Alf-Aage R Pettersen y cols. (2011)	CAD	219	160 mg Aspirina 75 mg Clopidogrel	≥55% VASP-PRI
Siller-Matula y cols (2012)	ICP	416	600 mg Clopidogrel 75 mg Clopidogrel	>69% VASP-IRP

4.3 DISPOSITIVOS DE USO INMEDIATO

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios que han evaluado las pruebas de función plaquetaria y la evolución clínica se han basado en técnicas como la agregometría por transmisión de luz o la citometría de flujo. Ambas metodologías presentan algunas desventajas comunes: no están disponibles en la mayor parte de los centros de diagnóstico y hospitalarios, son laboriosas y requieren la intervención de personal cualificado (3). Estos factores han limitado de manera importante el uso de las pruebas de función plaquetaria en la práctica clínica diaria, sin embargo en la actualidad existen dispositivos que nos permiten realizar estas pruebas de una forma sencilla y fácil de implementar en la misma.

4.3.1 PFA-100

El sistema PFA-100 evalúa las múltiples facetas de la hemostasia primaria ayudando a una rápida detección de los trastornos plaquetarios. Es un sistema in vitro que simula las fuerzas de cizalladura al iniciar el proceso de la hemostasia primaria, se ha demostrado que es muy eficaz fundamentalmente para la valoración de los pacientes antiagregados y para el diagnóstico de disfunciones plaquetarias hereditarias: enfermedad de von Willebrand, trombastenia de Glanzmann y síndrome de Bernard-Soulier pero menos eficaz en pacientes con alteraciones hemostáticas desconocidas, además de presentar ciertas limitaciones ya que sólo se debe tratar la sangre con citrato y no con plasma rico en plaquetas (PRP), los resultados pueden variar según las concentraciones de citrato, o según el grado de quelante cálcico del anticoagulante, además, puede no ser tan sensible en detectar los antagonistas plaquetarios del ADP (19). Sin embargo, es importante destacar que en algunos estudios clínicos, los resultados obtenidos mediante PFA-100 en

pacientes sometidos a terapia con Clopidogrel han ofrecido escasa correlación con los resultados obtenidos mediante agregometría óptica o citometría de flujo (26).

4.3.2 VERIFYNOW

Verify Now es el primer sistema para monitorizar de una manera, rápida, sencilla y precisa la respuesta individual a múltiples fármacos antiagregantes plaquetarios. Se basa en el mismo principio que la agregación plaquetaria, es decir, mide la reducción de la transmisión de la luz (turbidimetría) y cuantifica la luz residual transmitida emplea el mismo principio que la agregometría óptica, pero mide la aglutinación de capas cubiertas de fibrinógeno en sangre completa en respuesta al ácido araquidónico (8).

Sus grandes ventajas frente a la agregación plaquetaria son el uso de un pequeño volumen de sangre total anticoagulada, simplicidad, completa automatización del ensayo y rapidez en los resultados (25).

Aunque este método muestra una buena correlación con la agregometría por transmisión de luz, son pocos los estudios que han corroborado su valor pronóstico en el ámbito clínico. Es importante destacar que diferentes estudios han utilizado el análisis de la curva ROC para definir un umbral o punto de corte de la reactividad plaquetaria y de esta manera identificar el riesgo trombótico que pudieran presentar algunos pacientes que presentaran un PRU por encima del umbral. Cabe señalar que dichos puntos de corte podrían depender del subgrupo de pacientes estudiados. Hasta la fecha, los valores de corte se han investigado principalmente en pacientes sometidos a ICP. En la tabla 4 se puede observar que han sido propuestos diferentes puntos de corte para las unidades de reacción P2Y₁₂ (PRU) obtenidas mediante el dispositivo VerifyNow, que pretenden identificar con precisión aquellos pacientes en mayor riesgo de sufrir un evento trombótico adverso.

Tabla 4. Puntos de corte sugeridos por diferentes grupos de trabajo para las unidades de reacción P2Y₁₂ (PRU) medido por VerifyNow.

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

4.4 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y ANGIOPLASTIA CORONARIA

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son enfermedades del sistema circulatorio, de etiología y localización diversas. Se clasifican en seis tipos generales según la Organización Mundial de la Salud (OMS): cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatías congénitas y trombosis venosas profundas y embolias pulmonares.

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

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

Sin embargo, la rotura de la placa aterosclerótica coronaria, ya sea de manera espontánea o inducida (al ensanchar la luz vascular en la ICP) provoca una lesión en el endotelio exponiendo componentes de la matriz vascular que inducen a la activación de, las plaquetas circulantes creando un ambiente protrombótico (28).

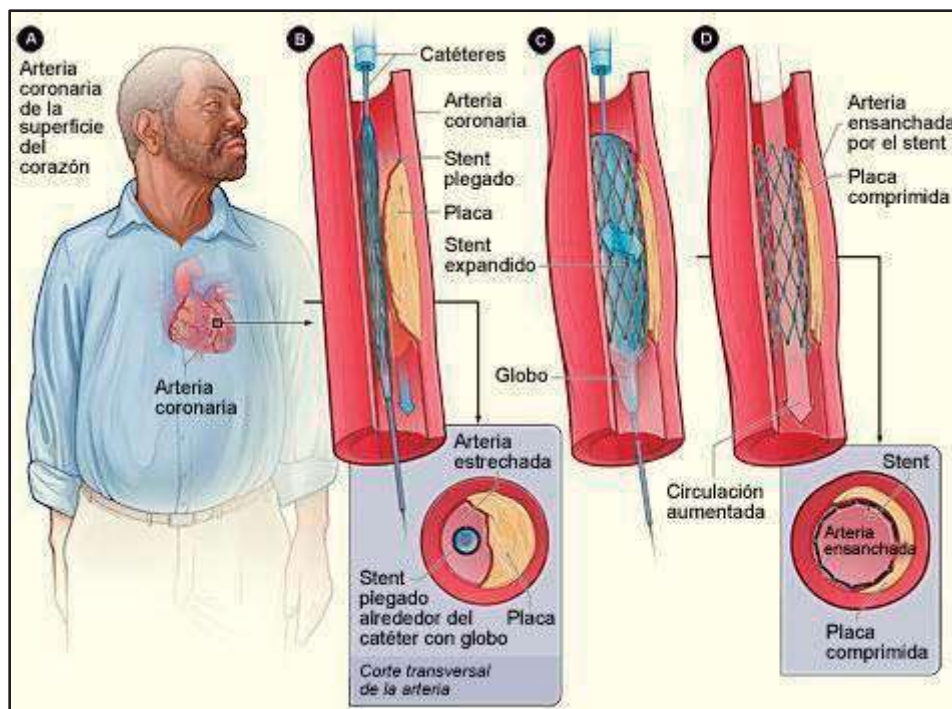


Fig. 2 Angioplastia con implantación de endoprótesis vascular (stent)

4.5 TERAPIA ANTIPLAQUETARIA

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

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

4.5.1 ASPIRINA

La aspirina (ácido acetilsalicílico) produce la acetilación irreversible de la ciclooxigenasa (COX) de las plaquetas (isoforma COX-1) y por ello reduce la síntesis de TXA₂ (1). Como las plaquetas son anucleadas y, por lo tanto, incapaces de llevar a cabo la síntesis proteínica, no pueden reponer la actividad enzimática, por lo que la inhibición plaquetaria se prolonga durante toda la vida de la plaqueta (7-10 días). La aspirina no inhibe la adhesión plaquetaria ni la agregación en respuesta a estímulos como el ADP, la trombina, el colágeno, las catecolaminas y el estrés de cizallamiento. Sin embargo, tiene diversos efectos no plaquetarios tales como inhibición de las prostaglandinas, inhibición de la síntesis de interleucina 6 en los leucocitos y la reducción de la actividad de los inhibidores de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), que se cree que contribuyen a explicar por qué sus efectos beneficiosos son más que lo que cabría esperar de la simple inhibición plaquetaria dependiente de un agonista relativamente débil como es el TXA₂ (28).

4.5.2 CLOPIDOGREL

El Clopidogrel (tienopiridina de segunda generación) es un profármaco que precisa de una biotransformación hepática para ser convertido en su metabolito activo, que es el que finalmente bloquea el receptor $P2Y_{12}$ (5). Aproximadamente, el 15% del Clopidogrel absorbido (el 85% se inactiva por esterasas) se transforma en el hígado mediante una oxidación en dos etapas por isoformas del citocromo P450 (CYP) (Fig. 3). Dado que la inhibición es irreversible, sus efectos persisten durante toda la vida de la plaqueta (10). Tiene un inicio de acción lento; requiere una dosis de carga (generalmente, 300 o 600 mg, esta última con efecto más rápido y potente) para acortarlo cuando se necesita una inhibición plaquetaria rápida, como en el contexto de un SCA o una ICP, y se continúa con una dosis de mantenimiento de 75 mg.

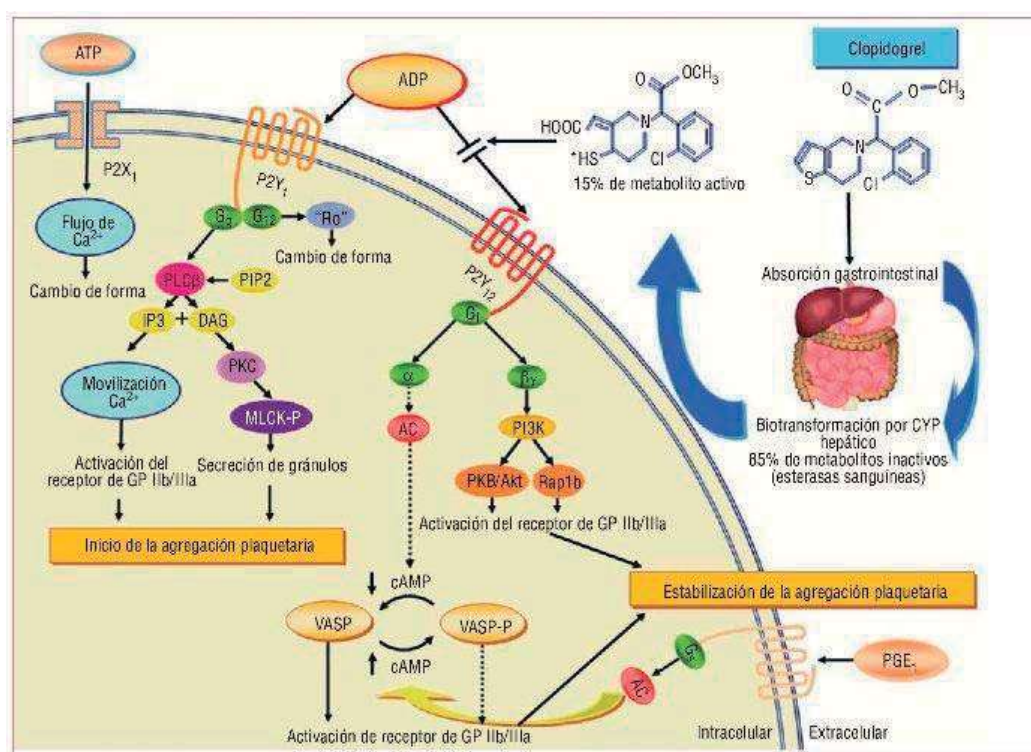
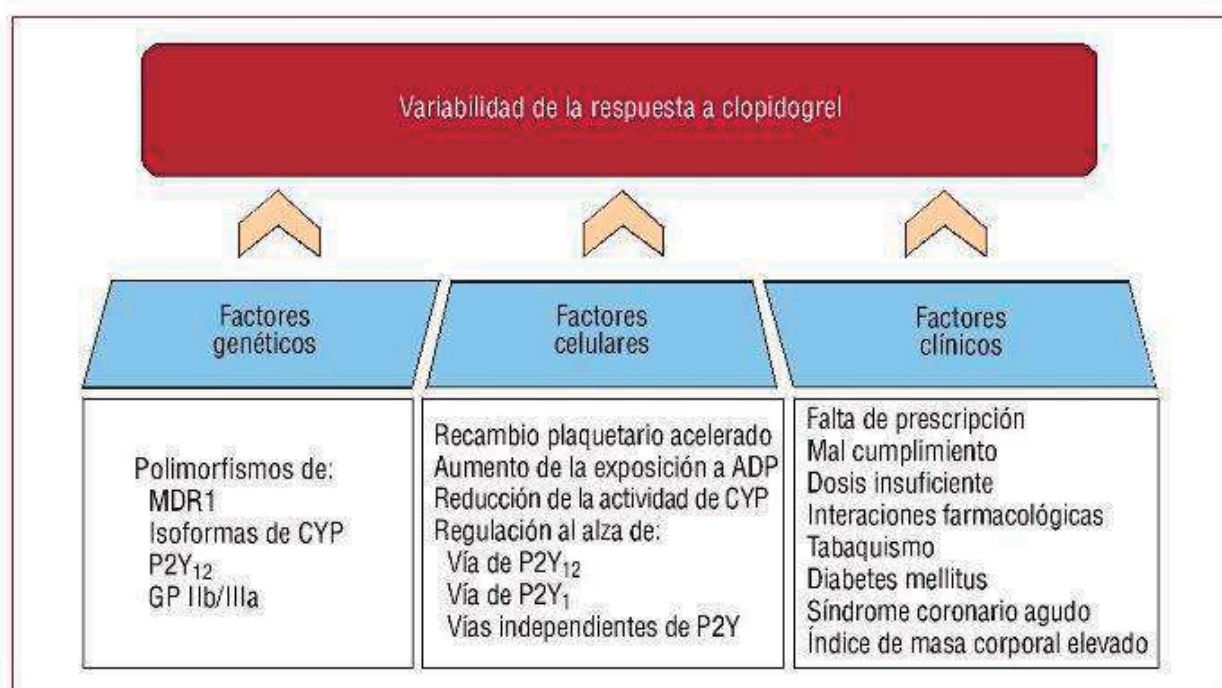


Figura 3. Mecanismo de acción del Clopidogrel

A pesar del beneficio clínico del Clopidogrel, un considerable porcentaje de pacientes presenta eventos isquémicos en el seguimiento. El Clopidogrel presenta una gran variabilidad interindividual de respuesta, uno de los principales mecanismos implicados en su eficacia limitada, al condicionar la existencia de un número de pacientes con una respuesta disminuida («resistentes» o «no respondedores»), que se asocia con un riesgo mayor de presentar eventos isquémicos en el seguimiento (13, 14, 64,65).

Los múltiples mecanismos que contribuyen a la variabilidad de respuesta al Clopidogrel se pueden agrupar en factores genéticos, celulares y clínicos (29).

Fig. 4 Posibles mecanismos involucrados en la variabilidad de respuesta al Clopidogrel.



4.5.3 PRASUGREL

El Prasugrel es una nueva tienopiridina y, como el Clopidogrel, un profármaco, pero, a diferencia de este, muestra una rápida y casi completa absorción tras la ingestión oral de su dosis de carga. Se metaboliza a continuación a su forma activa, la cual se une irreversiblemente al receptor de ADP $P2Y_{12}$ de las plaquetas durante toda la vida de estas. La consecuencia es la inhibición de la activación plaquetaria y la posterior disminución de la agregación de las plaquetas. El metabolito activo se origina por hidrólisis mediada por la carboxilesterasa intestinal seguido de la oxidación por la enzima citocromo P-450 intestinal y hepática (30).

El Prasugrel se metaboliza de forma más efectiva que el Clopidogrel, lo cual le confiere mayor efecto antiagregante y menor variabilidad en la respuesta plaquetaria, al ser mayor la cantidad de metabolito activo que llega a las plaquetas. Se inicia el tratamiento con una dosis de carga de 60 mg y se continúa con 10 mg al día. Los pacientes tratados con Prasugrel deben tomar AAS (de 75 a 325 mg al día). Sin embargo en pacientes mayores de 75 años no se recomienda el uso de prasugrel, ya que tienen mayor riesgo de hemorragias y una mayor exposición al metabolito activo. Si tras una valoración individual del beneficio / riesgo se estima la utilización en mayores de 75 años debe usarse la dosis de carga de 60 mg y una dosis diaria reducida de 5 mg. De igual forma en pacientes con un peso <60 kg tienen también un aumento en la exposición al metabolito activo y un aumento del riesgo de hemorragia, por lo que debe administrarse una dosis de carga de 60 mg y una dosis diaria reducida de 5 mg.

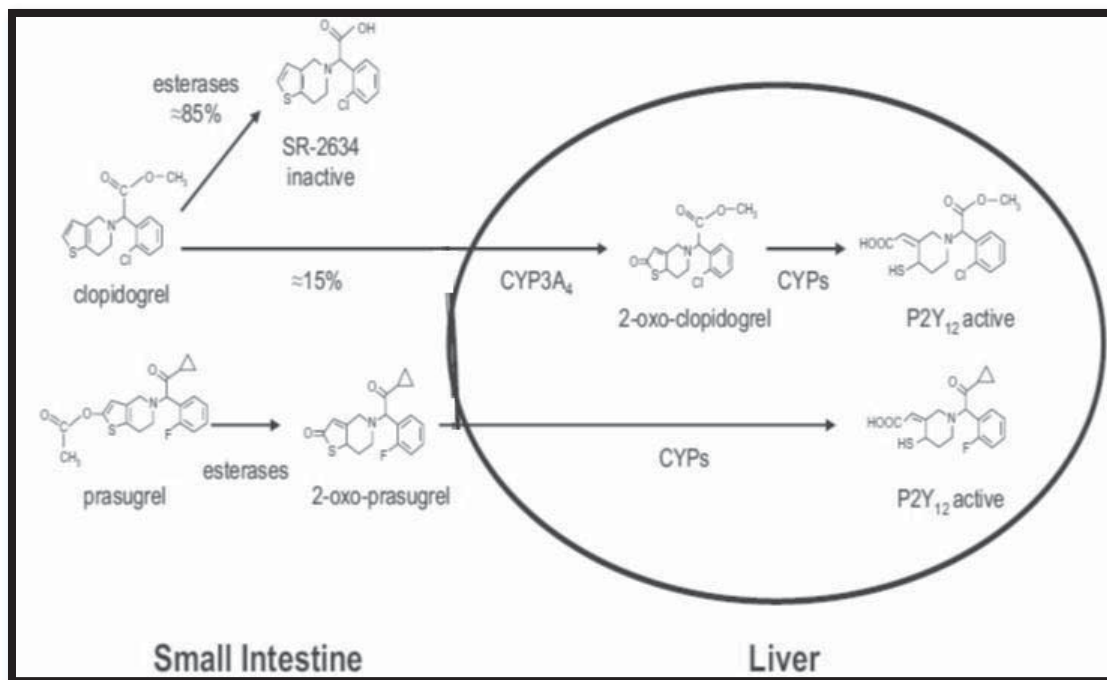


Figura 5. Vías metabólicas para la biotransformación de Prasugrel y Clopidogrel a metabolitos activos.

5. JUSTIFICACIÓN.

Existen diversos métodos para medir el grado de respuesta a terapia antiplaquetaria, tales como la agregometría óptica y la citometría de flujo, que han sido validados en estudios clínicos con números grandes de pacientes. De estos, el ensayo VASP-P2Y₁₂ mide específicamente el grado de inactivación del receptor de ADP P2Y₁₂ por el fármaco Clopidogrel. Los ensayos mediante dispositivos rápidos tales como el Verify Now han sido validados en estudios comparativos frente a agregometría óptica pero no se cuenta aún con suficiente información acerca de la correlación de los resultados que ofrece en comparación con la citometría de flujo.

6. HIPÓTESIS.

El equipo Verify Now es eficaz en la determinación de reactividad plaquetaria y brinda resultados que presentan una correlación positiva con los obtenidos por citometría de flujo.

7. OBJETIVOS.

7.1 OBJETIVO GENERAL.

Comparar la metodología de análisis VASP por citometría de flujo y el uso de un dispositivo de uso inmediato: Verify Now para el monitoreo clínico de antiplaquetarios orales.

7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar el efecto antiplaquetario del Clopidogrel por citometría de flujo mediante la persistencia de VASP fosforilado y evaluar el índice de reactividad plaquetaria (IRP) post carga y a las 24 horas de su administración.
- Determinar el efecto antiplaquetario del Clopidogrel y evaluar las unidades de reacción $P2Y_{12}$ post carga y a las 24 horas mediante el dispositivo de uso inmediato Verifynow.
- Correlacionar los estados de activación e inhibición plaquetaria con los datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.
- Identificar a pacientes respondedores y no respondedores a la dosis de carga de 600 mg del antiplaquetario Clopidogrel.

8. CRITERIOS.

8.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Pacientes que ingresaron a sala de Hemodinamia para angiografía diagnóstica y/o angioplastia coronaria, y que recibieran la dosis de carga de 600 mg de clopidogrel de 6 a 10 horas previas.

8.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Pacientes que no accedieron a participar en el proyecto mediante la firma de la carta de consentimiento informado.
- Pacientes con alteraciones hepáticas.
- Pacientes con IAM con elevación del segmento ST
- Pacientes que fueran sometidos a tratamientos con anticoagulantes orales o antidepresivos.

8.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- Pacientes cuyas muestras no fueron tomadas, procesadas u almacenadas en condiciones óptimas.
- Pacientes cuyas muestras resultaron lipemicas o hemolizadas
- Pacientes que decidieron retirarse del estudio

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 SITIO DE ESTUDIO.

Unidad de Hemodinamia del Hospital General “Dr. Miguel Silva” en la ciudad de Morelia y Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la división de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

9.2 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de cohorte, experimental, prolectivo y longitudinal.

9.3 SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

Pacientes que fueron ingresados a la sala de Hemodinamia para angiografía diagnóstica y/o angioplastia coronaria y que previamente (6 a 10 horas) recibieron una dosis de carga de Clopidogrel de 600 mg.

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

9.4 TOMA DE MUESTRA.

La primera muestra sanguínea (post carga) se obtuvo por punción femoral o radial previo a la intervención percutánea, se desecharon los primeros 5 ml para evitar la activación plaquetaria, la muestra sanguínea se dividió en 2 tubos para su estudio: 1 con citrato sódico 0,109 M, 3.2 % con capacidad de 2.7 ml y 1 con citrato sódico 0,109 M, 3.2 % con capacidad de 2 ml para el ensayo Verifynow, la segunda muestra se tomó a las 24 horas por punción venosa en el antebrazo en tubo con citrato sódico 0,109 M, 3.2 % con capacidad de 2.7 ml.

Todas las muestras fueron procesadas dentro de las 48 horas siguientes a la extracción, con mínima manipulación para evitar la activación plaquetaria. El tubo con la sangre se conservó a temperatura ambiente (18 -25° C) y no se abrió hasta el momento del análisis.

9.5 METODOLOGÍA

9.5.1 TÉCNICA DE FOSFORILACIÓN DE LA FOSFOPROTEÍNA ESTIMULADA POR VASODILADORES VASP POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Para la evaluación del estado de fosforilación del VASP, se utilizó como muestra la sangre total y un kit estandarizado de citometría de flujo para análisis de plaquetas. La muestra recolectada previamente en un tubo con citrato de sodio para la obtención de sangre total fue incubada en un primer tubo de polipropileno con prostaglandina E1 (PGE1) y en un segundo y tercer tubo con PGE1 y adenosin difosfato de sodio (ADP) por 10 minutos con agitación y fijada con paraformaldehído, posteriormente las plaquetas fueron permeabilizadas con un detergente no iónico. Posteriormente se incorporó el anticuerpo monoclonal primario dirigido contra el VASP, seguido de un anticuerpo secundario anti-VASP conjugado con isotiocianato de fluoresceína, y finalmente el

anticuerpo de detección plaquetaria dirigido contra el CD61 marcado con ficoeritrina (anti-CD 61 PE). La duración total de la preparación no excede los 30 minutos. El índice de reactividad plaquetaria (IRP) fue calculado a través del índice de fluorescencia media (IMF) de las muestras incubadas con PGE1 y PGE1 + ADP, de acuerdo con la formula para la obtención del índice de reactividad plaquetaria.

9.5.2 PREPARACION DE LOS TUBOS Y DE LA MUESTRA

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

Tabla 5. Preparación de los tubos y de la muestra para análisis VASP

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
5 µl de sangre total	5 µl de sangre total	5 µl de sangre total
5 µl de reactivo 2a (PGE1)	5 µl de reactivo 2b (PGE1 + ADP)	5 µl de reactivo 2b (PGE1 + ADP)
Homogeneizar durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex ajustado a velocidad lenta.		
Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.		
FIJACION (Formaldehído al 3%)		
5 µl de reactivo 3	5 µl de reactivo 3	5 µl de reactivo 3
Homogeneizar durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex ajustado a velocidad lenta.		
Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.		

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

9.5.3 ANALISIS. ADQUISICIÓN DE PLAQUETAS POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Las muestras se analizaron en el Citómetro de flujo FACS Altra (Beckman Coulter), con el programa Expo 3, antes de cualquier lectura se realizó la calibración del equipo con las perlas calibradoras (Flow-Check, cat. No. Beckman-Coulter Inc. Fullerton CA.) que contienen los fluorocromos FITC, PE, ECD, PC5. La adquisición de las plaquetas se 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 (2-4 micras)

9.5.4 FORMULA GENERAL PARA LA DETERMINACION DEL INDICE DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA.

El índice de reactividad plaquetaria (IRP) se calcula con el valor obtenido del Índice Medio de Fluorescencia (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 al 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 posteriormente se multiplica por 100 para obtener el IRP en porcentaje

El índice de reactividad plaquetaria (IRP) se calcula a partir de las medias corregidas de fluorescencia (MF_{lc}) de la muestra estudiada en presencia de PGE1 sola (PGE1) o de PGE1 + ADP (PGE1+ADP), según la fórmula siguiente:

Índice de reactividad plaquetaria (IRP) =

$$[(\text{MF}_{lc} \text{ PGE1} - \text{MF}_{lc} (\text{PGE1} + \text{ADP})) / \text{MF}_{lc} \text{ PGE1}] \times 100$$

9.5.5 ANALISIS. ADQUISICIÓN DE PLAQUETAS POR ENSAYO VERIFYNOW/P2Y₁₂

El sistema VerifyNow es un sistema de detección óptico basado en la turbidimetría que mide la agregación inducida por las plaquetas. El sistema consta de un instrumento, un dispositivo de prueba desechable y materiales de control de calidad. Entre las medidas de control de calidad esta un control de calidad electrónico (EQC, Electronic Quality Control)

basado en el instrumento, dos niveles de control de calidad con reactivos (WQC, Wet Quality Control) y controles de calidad internos. El instrumento gestiona toda la secuenciación de la prueba, controla la temperatura, realiza la mezcla reactivo-muestra y ejecuta autodiagnósticos. Se determina el grado de función plaquetaria y se muestra el resultado.

El dispositivo contiene un preparado liofilizado de esferas recubiertas con fibrinógeno humano, activadores de las plaquetas y solución reguladora. La muestra del paciente es sangre entera anticoagulada con citrato de sodio al 0.9% que el instrumento dispensa automáticamente desde el tubo al dispositivo de prueba.

La prueba de P2Y₁₂ está diseñada para cuantificar el bloqueo de los receptores plaquetarios P2Y₁₂, se basa en la capacidad de las plaquetas activadas para unirse al fibrinógeno. Las micropartículas recubiertas de fibrinógeno se agregan en sangre entera de forma proporcional al número de receptores GP IIb/IIIa plaquetarios expresados. El reactivo está formulado para medir concretamente la agregación plaquetaria mediada por el P2Y₁₂. La transmitancia de la luz aumenta a medida que las plaquetas activadas se unen y agregan las microesferas recubiertas de fibrinógeno. El instrumento mide este cambio de la señal óptica y comunica los resultados en unidades de reacción P2Y₁₂ (PRU). De modo similar se incorporan a un segundo canal del dispositivo de prueba otros dos activadores: iso-TRAP (péptido activador del receptor de trombina) con PAR4-AP (péptido activador de PAR4) y micropartículas recubiertas de fibrinógeno.

El instrumento mide el cambio de transmitancia basal de la muestra y comunica el resultado del porcentaje de inhibición para la muestra.

➤ **Extracción y manipulación de las muestras.**

1. Obtener una muestra de sangre desechando los primeros 5 ml si es una muestra obtenida de un catéter o con una aguja de calibre 21 o mayor en un tubo con citrato de sodio que se llene hasta el nivel marcado
2. Invertir suavemente el tubo al menos 5 veces para homogeneizar la muestra
3. Antes de la prueba se debe dejar reposar la muestra durante un mínimo de 10 minutos, pero no más de 4 horas.

La prueba VerifyNow comunica los resultados por cada análisis.

- Las unidades de reacción $P2Y_{12}$ (PRU) indican la cantidad de agregación mediada por el receptor $P2Y_{12}$ específica de la plaqueta y se calculan en función de la tasa y el grado de agregación plaquetaria en el canal de ADP
- El porcentaje de inhibición (%) es el cambio porcentual respecto a la agregación basal y se calcula a partir del resultado de PRU y el resultado BASE, que es una medición independiente basada en la tasa y el grado de la agregación plaquetaria en el canal basal. El resultado BASE sirve como estimación de la función plaquetaria basal del paciente independiente de la inhibición del receptor $P2Y_{12}$.

$$\% \text{ de Inhibición} = (\text{BASE} - \text{PRU}) \div \text{BASE} \times 100$$

10. ANALISIS ESTADISTICO.

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

Las variables se presentan en forma de media $\pm$ desviación estándar y recuentos (porcentajes). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de los datos de las variables continuas. Las variables continuas se compararon con la prueba de la T de Student para pruebas dependientes e independientes.

Los coeficientes de correlación se obtuvieron mediante la prueba de Pearson con significancia bilateral, y por una prueba de regresión lineal simple para obtener el coeficiente de correlación múltiple (R).

Se considero estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos).

11. RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio un total de 30 pacientes, 26 de los cuales fueron de sexo masculino y 4 del sexo femenino, con edad promedio de 60.5 ± 11.18 años. A 16 pacientes (58.3%) se les realizó angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) y a los 14 restantes (38.9%) coronariografía diagnóstica. Se verificó la distribución normal de las variables a incluir en los análisis. Las características demográficas y clínicas de la población del estudio se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Características demográficas y clínicas de la población de estudio.

Edad	(años)	60.5 ± 11.18
Hombres	(%)	86.6
Mujeres	(%)	13.4
Historial familiar	(%)	50
IMC	(kg/m ²)	27.2789
Tabaquismo	(%)	56.7
Dislipidemia	(%)	46.7
Hipertensión arterial	(%)	60
Diabetes mellitus	(%)	43.3
ACTP	(%)	58.3
Angiografía diagnóstica	(%)	38.9
Plaquetas	(10 ³ /dL)	206.29 ± 57.53
Hematocrito	(%)	42.07 ± 5.91
VPM	(fL)	9.37 ± 2.04

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

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

Tabla 7. Correlación de Pearson para las variables cuantitativas IRP-VASP y PRU-INHIBICION-VerifyNow

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

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

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

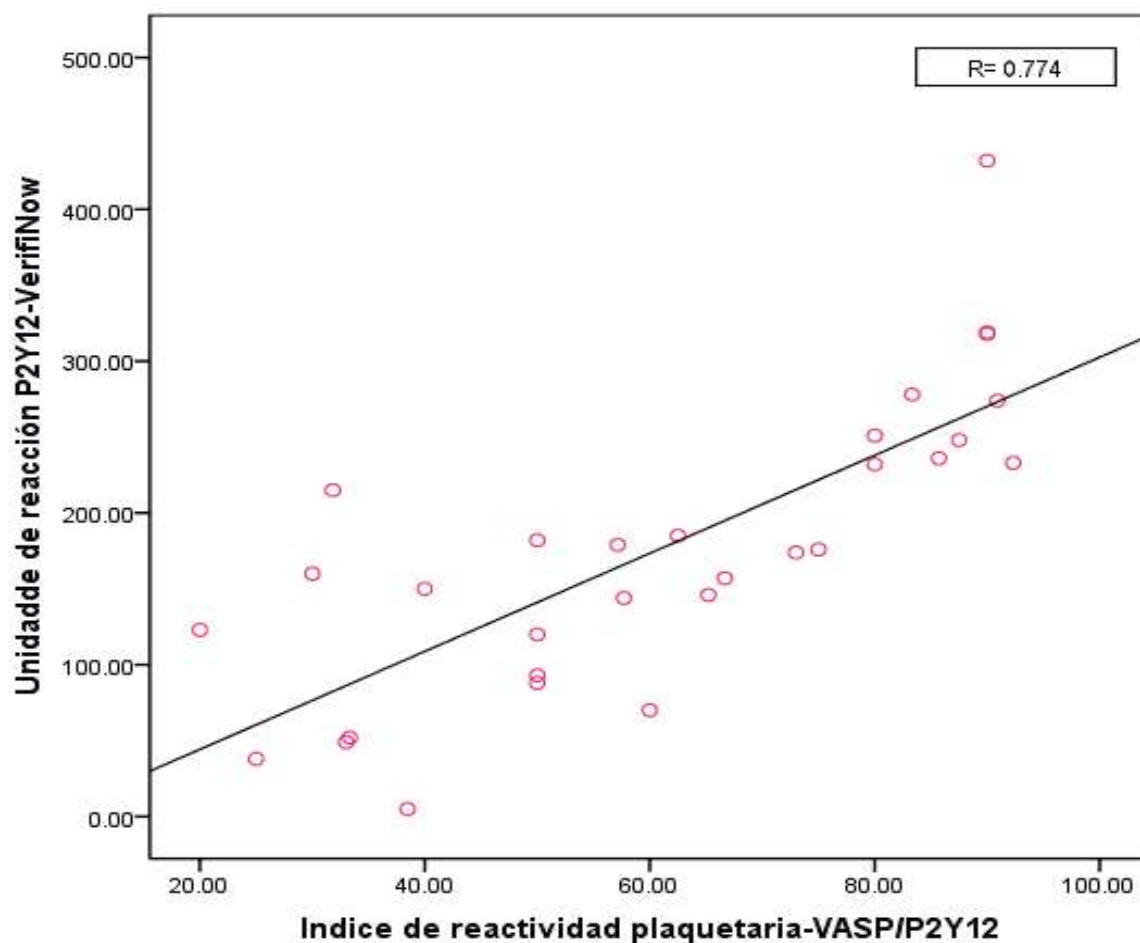


Fig. 6 *Correlación del IRP-VASP y PRU-VerifyNow.*

Se observa una relación lineal positiva entre las variables IRP y PRU, con un coeficiente de correlación (R) de 0.774

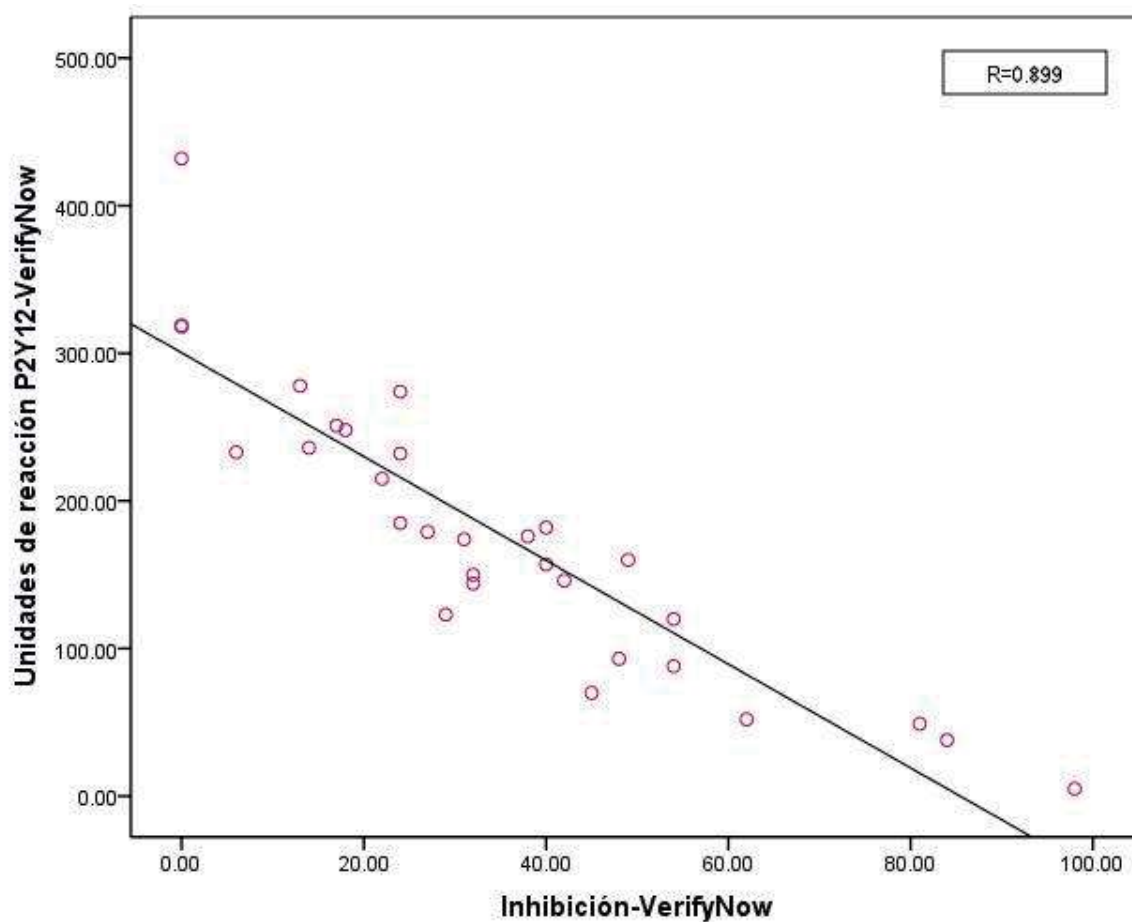


Fig. 7 Correlación PRU e Inhibición.

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

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

Tabla 8. Estadísticos descriptivos IRP toma post carga y 24 horas

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

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

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

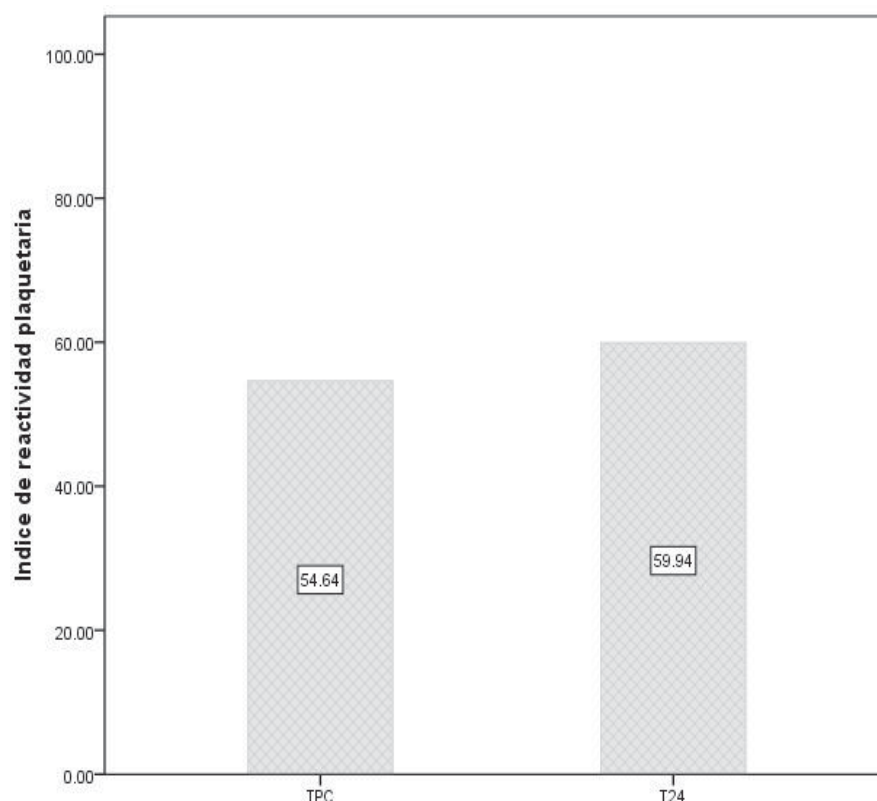


Fig. 8 Determinación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la evaluación del IRP toma post carga a las 24 horas de su administración.

Se determinó el efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante el uso del dispositivo de uso inmediato VerifyNow, se evaluaron las unidades de reacción $P2Y_{12}$ post carga ($n=30$) y a las 24 horas ($n=14$) de su administración.

Para poder llevar a cabo la comparación de medias de la unidades de reacción $P2Y_{12}$ (PRU) al igual que con el IRP se tomaron únicamente los datos de los pacientes que tenían los dos resultados ($n=14$), se obtuvo una media de PRU toma post carga (TPC) de 207.2149 ± 111.6830 y 139.4286 ± 66.41792 para la toma de 24 horas. Se realizó una prueba T para variables relacionadas, se obtuvo un valor de $p=0.036$.

Tabla 9. Estadísticos descriptivos PRU toma post carga y toma 24 horas

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

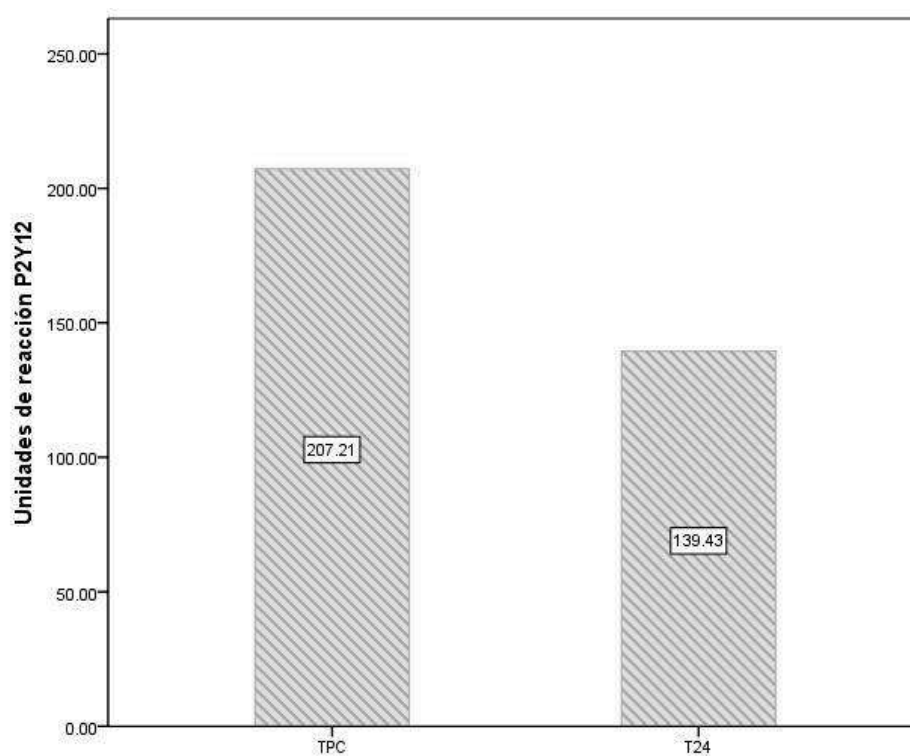


Figura 9. Determinación del efecto antiplaquetario del Clopidogrel mediante la evaluación del PRU toma post carga a las 24 horas de su administración.

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

Tabla 10. Comparación del IRP, PRU TPC y del IRP, PRU T24 de acuerdo al género

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

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

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

Tabla 11. Correlación del IRP y PRU toma post carga con los datos clínicos y demográficos de la población de estudio

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

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

Tabla 12. Correlación del IRP y PRU toma 24 horas con los datos clínicos y demográficos de la población de estudio

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

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

Tabla 13. Comparación de los datos de laboratorio contra IRP y PRU TPC

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

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

Se identifico a los pacientes con buena respuesta y con baja respuesta a la dosis de carga de 600 mg del antiplaquetario Clopidogrel por citometría def lujo mediante la persistencia de VASP fosforilado. Se clasifico a los pacientes de acuerdo al porcentaje de IRP mediante una distribución individual en cuartiles la cual se muestra en la tabla 14. Se realizó también una clasificación tomando un punto de corte del IRP del 69%, los resultados se resumen en la tabla 15.

Tabla 14. Distribución individual en cuartiles de la respuesta a Clopidogrel mediante el IRP TPC medido por VASP

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

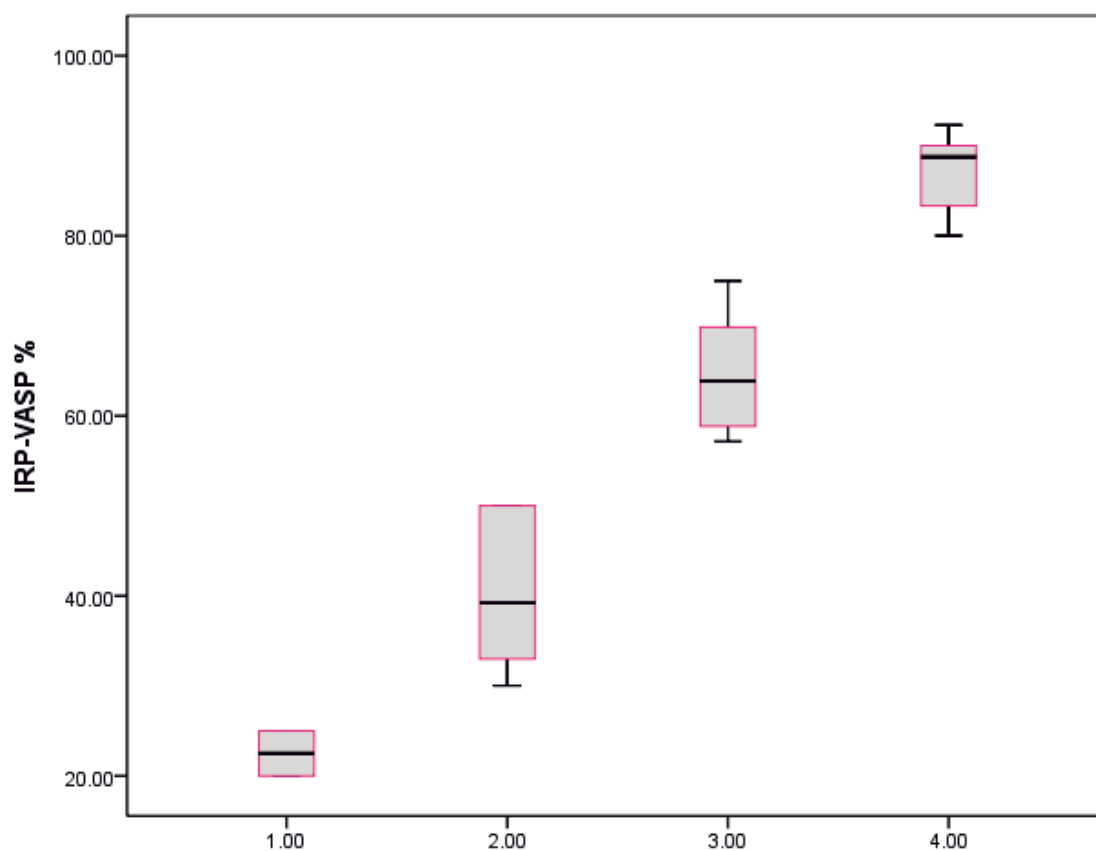


Figura 10. Distribución y variabilidad individual de índice de reactividad plaquetaria (IRP) medido por VASP en cuartiles.

Tabla 15. Distribución individual de la respuesta a Clopidogrel con un punto de corte del IRP-VASP TPC de 69%

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

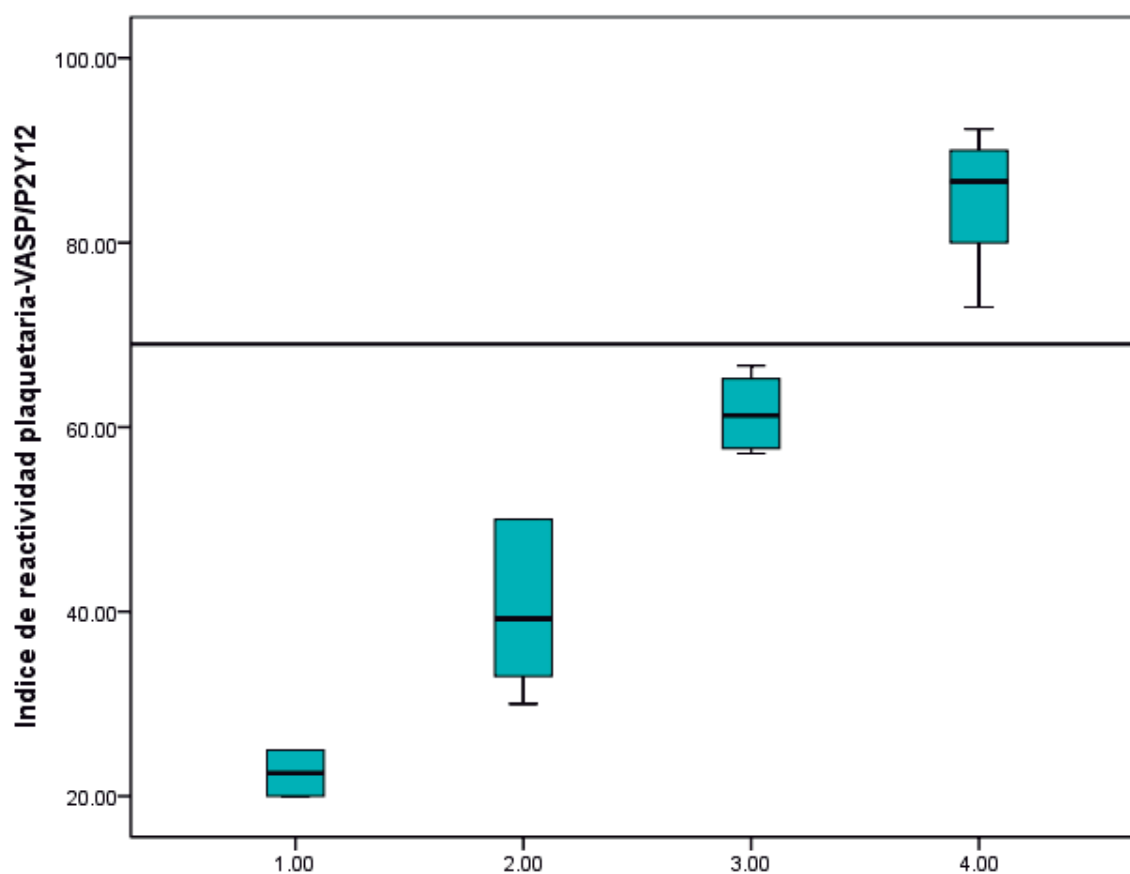


Figura 11 Distribución y variabilidad individual de índice de reactividad plaquetaria (IRP) medido por VASP con un punto de corte del 69%.

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

Tabla 16 Distribución individual de la respuesta a Clopidogrel en unidades de reacción P2Y12 (PRU) medido por VerifyNow

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

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

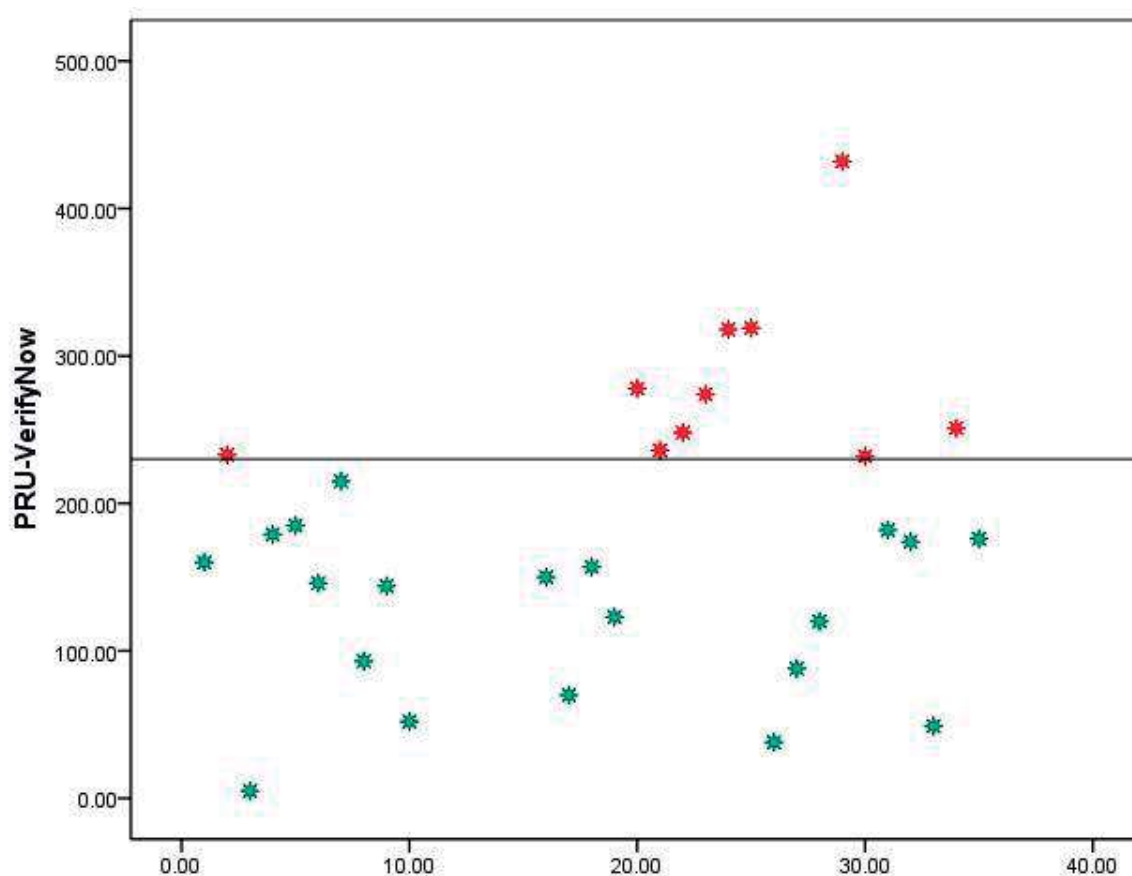


Figura 12 Distribución y variabilidad individual de las Unidades de reacción P2Y12 medido por VerifyNow Utilizando un punto de corte de >230 para pacientes «no respondedores» al tratamiento con Clopidogrel.

12. DISCUSION.

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

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

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

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

Es importante destacar que diferentes los estudios han utilizado el análisis de la curva ROC para definir un umbral o punto de corte de la reactividad plaquetaria asociada con el tratamiento de la combinación óptima de sensibilidad y especificidad para identificar el riesgo trombótico, la identificación de un punto de corte fiable permite a los médicos a distinguir a los pacientes con alta reactividad plaquetaria de aquellos con una baja reactividad, cabe señalar que dichos puntos de corte son motivo de una amplia

controversia ya que estos podrían depender del subgrupo de pacientes estudiados, el lugar y el perfil del paciente.

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

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

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

Por otro lado Aleil y cols. en 2005 (61) evaluaron el IRP en tres grupos, pacientes sanos, pacientes con enfermedad cardiovascular isquémica sin tratamiento con Clopidogrel y pacientes con enfermedad cardiovascular isquémica en tratamiento con Clopidogrel, ellos clasificaron a los dos primeros grupos como «no respondedores» al Clopidogrel al no encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.

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

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

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

respondedores» nuestra población de estudio ya que este punto es utilizado por uno de los grupos mas reconocidos, además de que es el que mostro una mejor correlación para predecir eventos adversos en el seguimiento de pacientes sometidos a ICP.

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

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

El primer grupo a los que se les determino el IRP TPC y T24 horas por citometría de flujo mediante la persistencia de VASP fosforilado fue conformado por 16 pacientes, se obtuvo una media de 54.6393 en la toma post carga y una media de 59.9413 en la toma de 24 horas, esta diferencia ($p= 0.445$) no fue significativa aunque si se puede apreciar un ligero aumento sobre la media del IRP T24 debido a que la dosis de mantenimiento de 75 mg de Clopidogrel es considerablemente menor a la dosis de carga de 600mg de Clopidogrel

administrada previa a la ICP, además de que el mismo procedimiento puede incrementar la actividad plaquetaria debido a la manipulación mecánica.

Al segundo subgrupo se les determino las unidades de reacción $P2Y_{12}$ TPC y T24 horas mediante el dispositivo de uso inmediato VerifyNow, este grupo estuvo conformado por 14 pacientes, se obtuvo una media de 207.2149 en la toma post carga y una media de 139.4286 en la toma de 24 horas, se obtuvo una $p=0.036$, en este grupo se observo una diferencia significativa entre ambas tomas. A pesar de que este grupo muestra un comportamiento contrario al del IRP ($n=16$) no son comparables entre si ya que se trata de pacientes distintos y este comportamiento de puede atribuir a que el tamaño de la muestra aun es muy pequeño y los resultados podrían variar de acuerdo al numero, sin embargo cabe mencionar que cada paciente presenta una respuesta diferente al antiplaquetario la cual se puede ver afectada por varios factores.

Otro de nuestros objetivos fue identificar a pacientes respondedores y no respondedores a la dosis de carga de 600 mg del antiplaquetario Clopidogrel, mediante el análisis VASP/ $P2Y_{12}$ y el dispositivo de uso inmediato VerifyNow/ $P2Y_{12}$.

Para identificar a nuestra población de estudio mediante al análisis VASP/ $P2Y_{12}$ se realizo una separación del IRP por cuartiles, se observo que solamente el 26.6% de los pacientes ubicados dentro de los dos primeros cuartiles se clasificaron como pacientes respondedores al Clopidogrel, el 36.7% se ubicaron dentro de los pacientes con poca respuesta al tratamiento y el 36.7% restante se clasifico como pacientes no respondedores al Clopidogrel.

Para la clasificación mediante el dispositivo de uso inmediato VerifyNow/ $P2Y_{12}$ se utilizo el punto de corte PRU >230 para la clasificación de pacientes no respondedores a la terapia con Clopidogrel, el 66.7% de los pacientes se ubicaron por debajo del punto de corte establecido y el 33.3% restante se ubicaron por encima del mismo por lo que se les clasifico como pacientes con baja respuesta al tratamiento. Cabe destacar que a ambas

técnicas arrojaron datos similares lo que reafirma que existe una buena correlación entre ellas ($R=0.774$).

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

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

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

Otra de las variables que mostró resultados significativos fue el Historial familiar en el que al comparar con las unidades de reacción P2Y₁₂ (PRU) toma 24 horas se observó que aquellos pacientes que presentaban historia familiar positivo ($n=5$) mostraron una media de 91.2000 PRU ($p=0.051$) la cual sorpresivamente fue menor a la media mostrada por pacientes con un historial familiar negativo ($n=9$) que tuvieron una media de 166.2222 PRU ($p=0.037$), lo anterior podría explicarse debido al tamaño de la muestra ya que debido a que se trata de una variable dicotómica a la que se respondía únicamente con una respuesta positiva o negativa no es posible establecer una correlación entre los resultados obtenidos.

13. RESUMEN DE RESULTADOS

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

14. CONCLUSION

Existe abundante evidencia que apoya que las pruebas de reactividad plaquetaria en la práctica clínica juegan un papel muy importante para estratificar el riesgo de los efectos cardiovasculares adversos en pacientes que se someten a una ICP. La mayoría de ensayos de función plaquetaria presentan el inconveniente de ser laboriosos y complejos, poco reproducibles y requieren personal cualificado. Por ello, su uso se restringe a laboratorios especializados y son difíciles de aplicar al estudio de todos los pacientes con sospecha de alteraciones plaquetarias congénitas o adquiridas, o con el objetivo de monitorizar la eficacia de la terapia antiagregante.

Como alternativa a esos métodos, en los últimos años se han desarrollado nuevos ensayos con equipos compactos que intentan reproducir in vitro la respuesta hemostática y pueden ser realizados de una forma rápida, con un volumen de sangre pequeño y sin una alta especialización de los operadores

En el presente estudio se observó una buena correlación entre PRU-VerifyNow y el IRP-VASP. El dispositivo VerifyNow es una prueba que permite estudiar la función plaquetaria a pie de cama y el alto grado de correlación observado proporciona una nueva alternativa, adecuada para poder guiar la terapia antiplaquetaria y poder definir un pronóstico de manera rápida y sencilla, sin embargo la determinación del IRP por el análisis VASP/P2Y₁₂ permite la identificación de pacientes ARPET proporcionando mayor confiabilidad en la monitorización de pacientes en tratamiento con Clopidogrel.

15. PERSPECTIVAS

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

16. REFERENCIAS

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

ácido acetil salicílico y al clopidogrel: una entidad clínica emergente. Revista Colombiana de Cardiología, Vol. 15 No. 4.

11. Víctor Hugco Córdova Pluma, P. V. (2011 Enero-Febrero). Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. Medicina Interna de México, 27(1):58-74.

12. Vinay Kumar, A. K. (s.f.). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier.

13. Antonio de Miguel Castro, C. C. (2009). La reactividad plaquetaria post-tratamiento predice los eventos adversos a largo plazo mejor que la respuesta al clopidogrel en pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST. Revista Española de Cardiología, 62(2):126-35.

14. Alf-Aage R Pettersen, H. A. (2011). The influence of CYP 2C19*2 polymorphism on platelet function testing during single antiplatelet treatment with clopidogrel. Thrombosis Journal, 9:4.

15. B. Al e i L, C. R. (2005). Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 3: 85–92.

16. Clinica, U. d. (s.f.). Obtenido de <http://www.upc.com.mx/pdfs/citometria.pdf>

17. Dominick J. Angiolillo, J. J. (2011). A pharmacodynamic comparison of prasugrel vs. high-dose clopidogrel in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing anti-Platelet Therapy In diabetes Mellitus (OPTIMUS)-3 Trial. European Heart Journal, 32, 838–846.

18. Kyoung-hoon Lee, S. (2009). The Significance of Clopidogrel Low-Responsiveness on Stent Thrombosis and Cardiac Death Assessed by the Verifynow P2Y12 Assay in Patients With Acute Coronary Syndrome Within 6 Months After Drug-Eluting Stent Implantation. Open Access.

19. Juan José Arrieta Blanco, B. B. (2006). Valoración del sistema PFA-100 para la determinación del tiempo de hemorragia en cirugía oral. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 11:E514-9.

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

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

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

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

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

17. ANEXOS

REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT VASP/P2Y₁₂

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

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

RECONSTITUCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

Nota: No congelar el kit.

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

EQUIPO UTILIZADO

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

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

SECRETARIA DE SALUD

HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"

CARTA DE **CONSENTIMIENTO INFORMADO** PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE ESTUDIO: "VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA MEDIANTE USO DE DISPOSITIVO A PIE DE CAMA PARA LA EVALUACION DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA EN PACIENTES SOMETIDOS A TERAPIA ANTIPLAQUETARIA"

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

PROPOSITO DEL ESTUDIO: Evaluar si se está teniendo una buena respuesta al tratamiento con Clopidogrel (Plavix) y Aspirina mediante la medición de la actividad plaquetaria.

PROCEDIMIENTO: Ha sido elegido para participar en este estudio, si usted desea participar, contestará preguntas acerca de su estado de salud. De igual forma proporcionará una muestra de sangre para realizar estudios de laboratorio y determinar ciertas proteínas que indicarán el estado de activación de las plaquetas (pequeñas células de la sangre encargadas de la coagulación y formación de trombos). El presente estudio no implica ningún riesgo para su salud.

BENEFICIOS PARA PARTICIPANTES: Los resultados aportarán información nueva e importante acerca del estado actual de la enfermedad y la manera como la población mexicana responde a estos tratamientos. En caso de detectarse cualquier alteración importante, usted será canalizado con el personal capacitado para su atención.

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

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA: Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. Además sé que puedo pedir información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio. Recibiré, si así lo solicito una copia de los resultados de laboratorio de los estudios que se me practiquen. Debo informar, tan pronto como sea posible a los investigadores de cualquier cambio importante que ocurra en mi salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (p. ej. tabaquismo, alcoholismo) o cambio de domicilio. Sé que las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio. Los costos del estudio los cubrirán los fondos del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular y el paciente no pagará por los estudios paraclínicos propios del proyecto de investigación.

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

Fecha _____

Teléfono _____

Paciente (Nombre y Firma)

Testigo (Nombre y Firma)



SECRETARÍA DE SALUD
MICHOACÁN
HOSPITAL GENERAL DR.
MIGUEL SILVA
STEC - PUERTO ESQ.
SAMUEL RAMOS
MORELIA MICH.
C.P. 58000

"MICHOACÁN TRABAJA"

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

ASUNTO: Aprobación de protocolo

Morelia, Michoacán, 26 de enero del 2010

Dra. Martha Eva Viveros Sandoval
Investigadora Principal
Presente

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

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

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

Sin otro particular le envié un cordial saludo

ATENTAMENTE

DR. GUILLERMO RINZO BRAVO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA



GPB*CCAM*sev