

Terapia Antiplaquetaria en Patología Vascular

Maria Teresa Santos, Antonio Moscardó, Isabel Madrid, Belén Cortina y Juana Vallés

Unidad de Aterosclerosis, Trombosis y Biología Vascular
Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe. Valencia, España.

La trombosis es el desencadenante de la aparición de los síntomas clínicos de la patología cardiovascular. La trombosis es una patología compleja, dinámica y multifactorial a la que contribuyen activamente: el endotelio, los factores plasmáticos de la coagulación, las células sanguíneas, los factores hemorreológicos dependientes de la geometría de los vasos y la viscosidad de la sangre. Entre las células sanguíneas, las plaquetas juegan un papel esencial en la trombosis, la hemostasia, el inicio y desarrollo de las enfermedades vasculares, y también de algunos aspectos del proceso inflamatorio asociados a la patología vascular¹.

En condiciones normales el endotelio es una superficie antitrombótica por su capacidad para sintetizar inhibidores de la función plaquetaria como la prostaciclina (PGI₂), el óxido nítrico (NO) o la CD39 (ecto-nucleotidasa), que degrada el ADP liberado por las plaquetas activadas reduciendo el reclutamiento plaquetario². Sin embargo, la alteración vascular o la presencia de placa de ateroma hace que el vaso se convierta en una superficie trombogénica sobre la que se inicia la adhesión y la subsiguiente activación plaquetaria. A ello contribuyen las estructuras subendoteliales del vaso, particularmente el colágeno. Posteriormente, en el entorno del vaso dañado se genera trombina otro potente estímulo plaquetario, que además convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que consolida el tapón hemostático o el trombo oclusivo.

La interacción de las plaquetas con sus agonistas fisiológicos inicia una compleja secuencia bioquímica de transmisión de señales intracelulares que diversifica y coordina las distintas respuestas funcionales. Entre estos elementos bioquímicos de transducción de señales se incluyen: los receptores específicos, las proteínas G, el metabolismo del fosfatidil-inositol, la síntesis de tromboxano A₂ (TXA₂) y de otros eicosanoides, los movimientos en el calcio citosólico, la regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos (AMPc, GMPc) y la fosforilación de proteínas tanto en residuos serina/treonina como tirosina³. A su vez, las plaquetas tienen un repertorio de distintas respuestas funcionales al estímulo que incluyen: adhesión, secreción de los componentes de los gránulos citoplasmáticos, agregación plaqueta-plaqueta, interacción con otras células sanguíneas, exposición de fosfolípidos procoagulantes en la membrana, que contribuyen a la generación de trombina, y su contribución a la retracción del coágulo que estabiliza el trombo. Adicionalmente, la liberación al microentorno de las plaquetas activadas del contenido de sus gránulos y de los productos metabólicos generados en su activación como nucleótidos de adenina, serotonina, eicosanoides, óxido nítrico, etc., (substancias pro y antiagregantes), inicia lo que se conoce como etapa de reclutamiento plaquetario y de crecimiento del trombo. Se ha comprobado experimentalmente que los liberados de las plaquetas activadas presentan una componente final proagregante cuando actúan sobre otras

plaquetas diana, efecto que se modula por la interacción de las plaquetas con los eritrocitos^{4,5} o los leucocitos⁶. También los productos liberados por las plaquetas activadas inducen modificaciones en el endotelio y en las células inflamatorias, condicionando la progresión de la aterosclerosis y de los procesos inflamatorios⁷.

I) Estrategias farmacológicas para el control de la función plaquetaria

El tratamiento con distintos fármacos antiplaquetarios tiene como objetivo genérico reducir la reactividad plaquetaria y, por tanto reducir las posibilidades de que si existe una estimulación plaquetaria “in vivo” se produzca la formación de un trombo oclusivo. Los fármacos hasta ahora disponibles y los que se encuentran en estudio, se basan en distintas estrategias para inhibir procesos clave en la secuencia bioquímica de actividad de las plaquetas (Tabla 1) a las que nos referimos a continuación.

a) *Modulación de las tasas de nucleótidos cíclicos.*

Es conocido que el estímulo de las plaquetas produce una disminución de las tasas de AMPc y un aumento en la concentración de calcio en el citosol. El aumento de calcio citosólico a su vez, activa los mecanismos de activación dependientes de calcio en la plaqueta, como la activación de la fosfolipasa A₂, la síntesis de eicosanoides, el proceso secretor, etc. Por el contrario, un aumento en la concentración de AMPc reduce la concentración de calcio en el citosol incorporándolo en el sistema tubular denso, lo que inhibe la función plaquetaria.

El nivel de AMPc en las plaquetas se regula por las actividades de la adenil ciclasa, que cataliza la conversión de ATP a AMPc, y de la fosfodiesterasa, que cataboliza el AMPc a 5'-AMP. Este mecanismo bioquímico es el que utilizan fisiológicamente la prostaciclina endotelial y la prostaglandina E₁ (PGE₁) para inhibir la función plaquetaria “in vivo”, activando la adenil ciclasa. La inhibición de la fosfodiesterasa, que mantendría los niveles de AMPc, se ha utilizado como estrategia farmacológica por distintos fármacos antiplaquetarios como el dipiridamol y el cilostazol. Ambos fármacos además inhiben la captación de adenosina por los eritrocitos, una sustancia que se produce fisiológicamente por degradación del ADP, el cual además activa a la adenil ciclasa plaquetaria y produce un efecto vasodilatador del endotelio⁸.

b) *Inhibición del efecto agonista del ADP.*

El reconocimiento de la importancia del papel del ADP en la formación del trombo plaquetario ha ido creciendo desde su descripción en 1961 como un factor derivado de los glóbulos rojos que influenciaba la adhesión plaquetaria⁹. El ADP se encuentra en grandes concentraciones (molares) en los gránulos plaquetarios que se liberan al medio extracelular de plaquetas activadas con agonistas fisiológicos (colágeno, trombina) y actúa tanto como mecanismo de amplificación de la respuesta en las plaquetas que lo liberan, como induciendo y potenciando el reclutamiento plaquetario^{4,5}.

La inhibición del efecto agonista del ADP bloqueando el receptor P2Y₁₂ de las plaquetas es el mecanismo de acción de fármacos ampliamente utilizados clínicamente en la actualidad, como las tienopiridinas más conocidas (ticlopidina, clopidogrel) y de las de nuevo diseño como el prasugrel, cangrelor o elinogrel¹⁰⁻¹². Un aspecto histórico curioso, es que tuvieron que pasar casi 40 años desde que se caracterizó el ADP como primer agonista plaquetario, hasta que se detectó la existencia de tres receptores de nucleótidos de adenina en las plaquetas (P2Y₁₂, P2Y₁, P2X₁)¹³ y hasta que finalmente en 2001 se aisló y clonó el receptor P2Y₁₂ sobre el que actúan las tienopiridinas¹⁴.

El ADP actúa sobre los receptores P2Y₁₂, y P2Y₁, mientras que el ATP actúa sobre el P2X₁, asociado a un canal de calcio. El receptor P2Y₁₂ está acoplado a la guanine-binding proteína G_i que señala inhibiendo la actividad de la adenil ciclasa y por tanto, reduciendo la concentración de AMPc, lo que favorece, como hemos indicado antes, la agregabilidad a ADP y la estabilización de los agregados plaquetarios. El bloqueo del receptor P2Y₁₂ inhibe este proceso reduciendo la agregabilidad y actúa sobre la actividad de proteínas cinasas dependientes de AMPc como la PKA que fosforila a VASP. Precisamente el efecto del bloqueo de P2Y₁₂ sobre la fosforilación de VASP se utiliza como marcador bioquímico para la determinación analítica del efecto de las tienopiridinas por citometría de flujo.

El receptor P2Y₁, en cambio, esta acoplado a la proteína G_q que señala activando a la fosfolipasa C_β, la cual inicia el metabolismo de fosfatidil inositol y el aumento de calcio en el citosol. Este mecanismo de acción del ADP sobre las plaquetas no se inhibe por las tienopiridinas. La respuesta completa a ADP se obtiene por la estimulación conjunta de P2Y₁₂ y P2Y₁¹⁵ lo que justifica que los inhibidores del receptor P2Y₁₂ sólo produzcan una reducción parcial de la agregación con ADP. La mayor inhibición de la agregación plaquetaria se ve experimentalmente con el bloqueo simultáneo de P2Y₁₂ y P2Y₁. No obstante, todavía carecemos de estrategias farmacológicas de uso clínico para el bloqueo de P2Y₁. Éste es un objetivo difícil, probablemente porque mientras P2Y₁₂ se encuentra casi exclusivamente en las plaquetas, P2Y₁ se detecta en muchos tipos celulares, lo que hace más difícil encontrar inhibidores específicos de esta vía de activación plaquetaria.

El clopidogrel es una pro-droga que necesita una transformación por las isoenzimas del citocromo P450 del hígado para obtener el metabolito activo (SR 26334) con efecto antiplaquetario¹⁰⁻¹². También el prasugrel es una prodroga que necesita metabolismo hepático, aunque posee una mejor farmacocinética. En cambio, el cangrelor y el ticagrelor son antagonistas directos y reversibles del receptor del ADP y no necesitan metabolismo hepático¹⁰⁻¹². El metabolito activo del clopidogrel se une irreversiblemente a P2Y₁₂ mediante la formación de puentes disulfuro entre el grupo tiol del metabolito activo y dos residuos cisteína extracelulares (Cys 17 y Cys 270) del receptor¹⁶ y su efecto sobre la función se mantiene durante el tiempo que la plaqueta esté en circulación. En este caso, como en el de la aspirina, hay que tener en cuenta el recambio plaquetario diario, normalizándose la función a los 5-7 días

de interrumpir el tratamiento. En cambio, el cangrelor (intravenoso) y el ticagrelor (oral) se unen a P2Y₁₂ de forma reversible, recuperándose la función horas después de interrumpir el tratamiento¹⁰⁻¹².

Teniendo en cuenta que el P2Y₁₂ no es el único receptor para el ADP en las plaquetas, no es de extrañar, que el tratamiento estándar con clopidogrel resulte en una inhibición parcial (< 50%) de la agregación plaquetaria inducida por ADP (5-20 μM). No obstante, la inhibición del receptor P2Y₁₂ inestabiliza el agregado plaquetario induciendo, en algunos sujetos, y dependiendo de la concentración de ADP empleada, la reversibilidad de la agregación. La respuesta subóptima a clopidogrel en los pacientes es variable entre distintos estudios usando técnicas diferentes (4-30%).

La variabilidad de respuesta al clopidogrel sobre la agregación plaquetaria en los pacientes está ampliamente demostrada^{17,18}. También existen datos que asocian una elevación de la función plaquetaria con una peor evolución clínica¹⁹. Los factores que actualmente se cree que influyen en la variabilidad del clopidogrel se muestran en la Tabla 2^{20,21}. Entre estos factores la baja disponibilidad del metabolito activo, es probablemente relevante. Un condicionante importante es su metabolismo por el citocromo P450, que podría reducirse por medicaciones concomitantes metabolizadas también por el citocromo. Por otra parte, la presencia de polimorfismos del citocromo P450 influyen en la biodisponibilidad del metabolito activo del clopidogrel por lo que algunos autores han sugerido la conveniencia de una evaluación rutinaria de variantes genéticas en pacientes tratados con clopidogrel²². El hecho de que un aumento de dosis de clopidogrel reduzca la proporción de pacientes con mal control²³, también apoya diferencias de metabolismo del fármaco en la variabilidad del efecto antiplaquetario. Por otra parte, los nuevos fármacos como el prasugrel y el ticagrelor, que inhiben más y más uniformemente la función de las plaquetas^{24,25}, también presentan un mayor beneficio clínico respecto a la isquemia, a expensas de un mayor riesgo hemorrágico^{26,27}.

c) Antagonistas del receptor GPIIb/IIIa

La unión del fibrinógeno a la conformación activa del receptor GPIIb/IIIa para formar puentes entre plaquetas contiguas es el punto final que regula la agregación plaquetaria inducida por todos los agonistas. Por ello, el bloqueo de GPIIb/IIIa es una interesante diana farmacológica para evitar la formación de agregados plaquetarios en pacientes de muy alto riesgo o con un proceso trombotico activo.

La idea inicial de este enfoque farmacológico surgió del Dr. Coller, que comprobó que un anticuerpo de ratón, el 7E3 inducía en plaquetas normales un fenotipo tromboasténico²⁸. Posteriormente, y debido a la preocupación por la respuesta inmunológica al anticuerpo 7E3, se produjo un nuevo anticuerpo quimérico ratón/humano, el 7E3 Fab (abciximab) de uso clínico²⁹. La agregación plaquetaria inducida por ADP 20 μM se ve prácticamente anulada cuando la concentración del anticuerpo bloquea el 80% de las aproximadamente 80.000 moléculas de

GPIIbIIIa que posee cada plaqueta. La agregación plaquetaria se recupera en aproximadamente un 50% respecto a los valores pre-tratamiento a las 24- 36 h de interrumpirse³⁰ Otros bloqueantes del receptor GPIIbIIIa actualmente en uso clínico son el tirofiban y el eptifibatide, también de administración intravenosa. Ambos se unen con rapidez al receptor GPIIbIIIa y su efecto desaparece antes que el del abciximab al interrumpir el tratamiento. Aproximadamente a las 4 horas de interrumpir la infusión de estos fármacos, la agregación plaquetaria se recupera un 50% y su eliminación depende del aclaramiento renal³¹. El tirofiban es un derivado no peptídico de tirosina diseñado como mimético de la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD)³², mientras que el eptifibatide es un heptapéptido cíclico sintético diseñado con la secuencia Lys-Gly-Asp (KGD)³³, que también inhibe la unión de fibrinógeno y FvW a las plaquetas. Ambas sustancias tienen aprobado su uso en las intervenciones percutáneas coronarias y en pacientes con síndrome coronario agudo. Un aspecto de interés es que el bloqueo del receptor GPIIbIIIa no tiene influencia sobre la síntesis del TXA₂ o la secreción de gránulos de las plaquetas, por lo que estos fármacos se administran asociados a aspirina.

El intento de producir moléculas que bloqueen el receptor GPIIbIIIa de administración oral, para el tratamiento antitrombótico crónico (xemilofiban, orbofiban, sibrafiban y lotrafiban) no ha resultado fructífero. Estas sustancias no aumentan el beneficio de la aspirina y pueden causar un aumento de mortalidad³⁴.

Teniendo en cuenta que el receptor GPIIbIIIa necesita una etapa de cambio conformacional de la forma en reposo a la forma activa capaz de unir fibrinógeno, existe la posibilidad teórica de actuar sobre los mecanismos intracelulares que inducen este cambio conformacional. Estos están modulados por la fosforilación de proteínas en residuos serina, treonina³⁵ y en tirosina³ y por el ensamblaje de la cadena β_3 del receptor GPIIbIIIa a proteínas del citoesqueleto como la talina³⁶. Estudios experimentales en nuestro laboratorio indican que la inhibición de la fosforilación de tirosinas reduce la activación del receptor en plaquetas estimuladas por trombina monitorizada por unión del anticuerpo PAC-1 mediante citometría de flujo³. Además, la inhibición de fosforilación en tirosina “in vitro” asociada a tratamiento con aspirina, inhibe algunos de los mecanismos de activación de las plaquetas insensibles a aspirina (COX-1-independientes) en plaquetas estimuladas con trombina, como la reorganización del citoesqueleto y la traslocación de proteínas fosforiladas al mismo para formar complejos multimoleculares de señalización; estos efectos se reflejan en una potenciación del efecto inhibitorio de aspirina sobre la agregación y la secreción plaquetaria³. El estudio de estrategias farmacológicas orientadas a actuar sobre mecanismos mediados por fosforilación de proteínas podría proporcionar avances en el tratamiento antitrombótico, hoy exclusivamente en el ámbito experimental.

d) Metabolismo del ácido araquidónico

La estimulación plaquetaria aumenta, como hemos comentado, la concentración de calcio citosólico y la activación de la fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂). Estos procesos se regulan por la actividad de las serina/treonina fosfatasas PP1/PP2A³⁷. La cPLA₂ activada libera el ácido araquidónico de los fosfolípidos que posteriormente se metaboliza por la vía lipooxigenasa para formar el hidroxiácido 12-HETE y por la ciclooxigenasa-1 (COX-1) para sintetizar endoperóxidos cíclicos PGG₂/PGH₂, que por la acción de la tromboxano sintetasa formarán tromboxano A₂. También se forman pequeñas cantidades de otras prostaglandinas y otros eicosanoides. La síntesis de eicosanoides plaquetarios vía COX-1 y la producción de 12-HETE se incrementan marcadamente en el curso de la interacción eritrocito-plaqueta⁴

El efecto mejor caracterizado de la aspirina es su capacidad para acetilar una serina en la posición 529 de la COX-1, produciendo inhibición irreversible de la actividad³⁸. Esto resulta en la inhibición de la síntesis de TXA₂, lo que es de importancia, ya que el TXA₂ es una sustancia que amplifica la función de las plaquetas que lo producen, es vasoconstrictor^{39,40} y regula el reclutamiento plaquetario por activación de otras plaquetas circulantes^{4,41}.

La inhibición de la COX-1, particularmente con aspirina, el fármaco más utilizado, previene en un 25% la aparición de un nuevo evento vascular en distintos tipos de pacientes con patología vascular. La prevención del infarto de miocardio es más elevada (1/3), mientras que la de los accidentes cerebrovasculares es menor (1/4)⁴². Estos datos, derivados de un meta-análisis en 135.000 pacientes reclutados en distintos estudios, definen claramente el beneficio clínico del tratamiento antiplaquetario con aspirina, pero también indican que no existe una efectividad clínica uniforme. Existe un número elevado de pacientes que sufren un nuevo episodio, a pesar del tratamiento con aspirina.

Además de su efecto sobre la síntesis de TXA₂, la aspirina puede contribuir a su efecto beneficioso mediante otros mecanismos⁴³. Estos incluyen la reducción en la progresión de la aterosclerosis, ej. reduciendo la oxidación de las LDL⁴⁴ o mejorando la disfunción endotelial⁴⁵. Además de las plaquetas, otras células sanguíneas (leucocitos y eritrocitos) pueden afectarse por la aspirina en su función y/o en los efectos de su interacción con las plaquetas. En este sentido es conocido que la interacción eritrocito-plaqueta estimula la reactividad trombocitaria, un efecto que se modifica por el tratamiento con aspirina^{4,5,41,46-48}, mientras que la interacción leucocito-plaqueta la inhibe, un efecto que se amplía con aspirina^{6,49}.

El metabolismo transcelular de eicosanoides también puede jugar un papel en los efectos antitrombóticos de la aspirina. Mediante este mecanismo, el ácido araquidónico o metabolitos del mismo generados por una célula, pueden ser transformados por otra a un eicosanoide con efectos biológicos distintos. Esta cooperatividad metabólica puede tener lugar entre distintas células sanguíneas y el endotelio^{50,51}. En este sentido, el descubrimiento de la COX-2 inducible⁵² y su presencia en células relevantes en la trombogénesis (células endoteliales, monocitos, macrófagos o las propias plaquetas) es un aspecto importante. Mediante metabolismo transcelular se puede formar TXA₂ por la interacción de plaquetas

tratadas con aspirina y PGH_2 formado por células endoteliales o monocitos/macrófagos de la placa vía COX-2 y/o COX-1 y también a la inversa, la célula endotelial podría sintetizar PGI_2 a partir de endoperóxidos plaquetarios^{50,51}. Este último mecanismo bioquímico es la base racional que dio lugar a la creación de fármacos inhibidores de la TXA2 sintetasa (ridogrel, isbogrel, dazoxiben) y de fármacos que inhiben simultáneamente el receptor del TXA2 y la tromboxano sintetasa (picotamida, terbogrel, S18886).

Desde un punto de vista analítico, se comprobó en los estudios iniciales de Grotemeyer y Cols⁵³ y de Helgalson y Cols⁵⁴ que existen pacientes que experimentan una inhibición menor de la esperada por aspirina en distintos tests de función plaquetaria. Este efecto denominado actualmente resistencia a aspirina se ha descrito actualmente en numerosos artículos utilizando distintas técnicas de laboratorio, aunque los mecanismos implicados y los test mas apropiados para su evaluación continúan siendo un tema de candente debate.

Los datos hasta ahora disponibles, todavía escasos, sugieren que los pacientes con inhibición insuficiente de la función por aspirina en tratamiento crónico tiene una mayor probabilidad de recurrencia⁵⁵⁻⁵⁸. También en pacientes con síndrome coronario agudo, la resistencia a aspirina se asocia a mionecrosis⁵⁹ y recurrencia clínica⁶⁰.

Teniendo en cuenta la potencial implicación clínica de una respuesta insuficiente al tratamiento antiplaquetario, surge la pregunta de qué pruebas de función plaquetaria serían más apropiados para detectar esta variabilidad de respuesta. No existe en la actualidad consenso en la literatura, aunque sí parece necesario aumentar el esfuerzo investigador en este área. En la sección siguiente se describen las técnicas más importantes actualmente disponibles en el laboratorio para monitorizar el efecto de los fármacos antiplaquetarios

II. Técnicas de laboratorio para monitorizar el efecto de fármacos antiplaquetarios

Como se ha comentado, las plaquetas son células complejas que responden al estímulo con distintas respuestas funcionales en las que participan diferentes secuencias señalizadoras. No existe un parámetro analítico que englobe, de forma general, todas las funciones de las plaquetas. Este es un problema esencial en el avance en la monitorización del efecto funcional de los fármacos antiplaquetarios en el laboratorio y, como cabría esperar, la variabilidad en la respuesta a la aspirina y/o clopidogrel es distinta cuando se utiliza uno u otro procedimiento de laboratorio ya que la dependencia del TXA₂ (inhibido por aspirina) o del ADP en lo que al receptor P2Y₁₂ se refiere (diana del clopidogrel) no es la misma en las distintas respuestas funcionales de las plaquetas, por lo que, como se ha indicado, la proporción de pacientes con mal control es variable en los distintos estudios utilizando distintas técnicas, diferencias también atribuibles a los distintos tipos de pacientes o estadios clínicos de evolución.

En cambio, como veremos, sí es posible conocer desde un punto de vista bioquímico el nivel de efecto del fármaco sobre su diana farmacológica específica. En el caso de la aspirina esta es la

inhibición de la COX-1 y subsiguiente síntesis de TXA₂, afectando a las respuestas funcionales TXA₂ o COX-1-dependientes, pero no aquellas COX-1-independientes o insensibles a aspirina. En el caso del clopidogrel, y teniendo en cuenta la existencia en la plaqueta del receptor P2Y₁ además del P2Y₁₂, se toma la fosforilación de la proteína de señalización VASP como efecto farmacológico, utilizando unas condiciones experimentales en las que se trata de minimizar el efecto funcional de P2Y₁, que comentamos más adelante.

Las técnicas de función actualmente disponibles para monitorizar efecto de antiplaquetarios miden: agregometría, adhesión-agregación, activación, reclutamiento, y tromboelastografía modificada.

I) Agregometría.

Entre las respuestas funcionales de las plaquetas, no cabe duda de que la agregación o unión de plaquetas entre si para formar un trombo, es una etapa esencial en la trombogénesis y su reducción por los fármacos antiplaquetarios es muy probablemente un componente esencial del beneficio clínico. Por eso, entre las técnicas de monitorización del efecto de los fármacos antiplaquetarios, el estudio de la agregación plaquetaria por agregometría óptica con distintos inductores es la prueba mas utilizada, como lo ha sido a lo largo de los últimos 50 años en la comprensión de la fisiopatología plaquetaria, por eso se le considera el estándar de oro.

I.1) Agregometría óptica en plasma rico en plaquetas. Fundamento: Mide el incremento del paso de luz que se produce a través de una suspensión de plaquetas en plasma (PRP) por la agregación de las mismas en respuesta a un agonista. El plasma pobre en plaquetas autólogo sirve de control. Requiere para su correcta realización personal cualificado y una buena estandarización de las fases analíticas y preanalíticas del ensayo, obteniéndose entonces unos coeficientes de variación técnicos muy aceptables 4-7%.

No es una técnica que pueda emplearse de forma rutinaria o como “point of care” (POC) en un número elevado de pacientes debido al tiempo necesario para su realización, aunque es muy empleada en los estudios de investigación sobre el efecto de los fármacos antiplaquetarios y es el test de referencia para otras técnicas. La agregación inducida por ácido araquidónico (AA) es muy informativa sobre el efecto de la aspirina en las plaquetas, ya que ésta se produce principalmente por el TXA₂ formado a partir del ácido graso exógeno. No obstante, hay que tener en cuenta que en la respuesta agregatoria final al ácido araquidónico también puede contribuir el ADP liberado de los gránulos si la cantidad de TXA₂ formado induce secreción, por lo que su especificidad para monitorizar el efecto de aspirina es menor que la cuantificación directa de la síntesis de TXA₂, a la que nos referiremos más adelante. Así mismo, la agregación en PRP inducida por ADP monitoriza el efecto de los antagonistas de P2Y₁₂ como las tienopiridinas. La agregación con el mimético de trombina (TRAP o iso-TRAP) se utiliza a veces de control, ya que a alta concentración la agregabilidad de las plaquetas es prácticamente

independiente de aspirina o clopidogrel.

I.2) Agregometría de Impedancia. El agregómetro de impedancia diseñado en 1980⁶¹ y todavía comercializado por Chrono-Log (Chronolog Corporation, USA), fue el primero en dar respuesta a la inquietud de que el medio fisiológico de las plaquetas es la sangre total y no el PRP. Su principio más que óptico es eléctrico. El equipo mide cambios en la resistencia al paso de corriente cuando las plaquetas se depositan sobre un electrodo. Uno de los equipos Chrono-Log mide simultáneamente la reacción de liberación (Lumiagregómetro). Este sistema de agregación se ha facilitado actualmente con un nuevo equipo multicanal y computarizado, el Multiplate (Dinabyte GmbH, Germany), que utilizando los distintos agonistas plaquetarios permite la monitorización del efecto de los tres antiplaquetarios utilizados en la clínica: aspirina, clopidogrel y GPIIb/IIIa. Muestra una aceptable asociación con la gregometría óptica y coeficientes de variabilidad⁶².

I.3) VerifyNow® (Accumetrics Inc., USA). Antes llamado Ultegra Platelet Function Analyzer. Fundamento: la técnica mide los cambios de transmisión de luz originados por la aglutinación de bolitas recubiertas de fibrinógeno en sangre total al unirse a ellas las plaquetas activadas, un proceso dependiente de la glicoproteína GPIIb/IIIa. En la actualidad el equipo dispone de cartuchos específicos para monitorizar el efecto de aspirina, de los bloqueantes del receptor P2Y₁₂ y de los antagonistas del receptor GPIIb/IIIa. Es un método de agregometría muy facilitado (POC) que no requiere pipeteo de la muestra, ya que el análisis se realiza directamente en el tubo de extracción de sangre. En todos los casos el fabricante da los puntos de corte de buen y mal control de los test utilizados para controlar los fármacos en unidades arbitrarias.

I.4) Plateletworks. (Helena Laboratories, USA). El método consiste en la detección cuantitativa de agregados plaquetarios en sangre total. Para ello se realiza un doble recuento de plaquetas en sangre total en un tubo anticoagulado con EDTA (para evitar la agregación) y en otro tubo de citrato, en presencia de un agonista plaquetario. La diferencia en el número de plaquetas aisladas entre los dos tubos daría el porcentaje de agregación. Requiere para este conteo un contador de células basado en el principio de impedancia. Es una facilitación del método de Wu y Hoak⁶³, ya que los tubos de extracción ya contienen los reactivos necesarios. La principal limitación es que se recomienda una rápida lectura (<10 min.) lo que lo limita en el uso rutinario en pacientes⁶⁴.

I.5) Sistema de activación-reclutamiento. Consiste en un sistema dual de células: el sistema generador y el sistema de ensayo. En el sistema generador se estimula PRP o sangre total con colágeno fibrilar (10 seg.) y rápidamente se centrifuga (13.000 xg, 1 min.) para obtener un liberado celular. En este liberado se cuantifican diversos parámetros de activación plaquetaria: liberación de gránulos densos (¹⁴C-5HT) y de gránulos α (β-tromboglobulina) y síntesis de TXA₂. Adicionalmente, una alícuota del liberado se utiliza, inmediatamente a su producción, como inductor de la agregación de otras plaquetas autólogas (sistema de ensayo) y la respuesta

agregatoria (reclutamiento) se detecta por agregometría óptica^{4,5} o citometría de flujo⁴¹. Es interesante destacar que el estudio del reclutamiento consiste realmente en una agregometría óptica, en la que se usa como inductor de la agregación, en vez de productos de laboratorio (ADP, TRAP, etc.), el agonista fisiológico que es el liberado celular de activación del propio paciente a examen, por lo que cabría esperar una mayor aproximación a la fisiología de la reactividad plaquetaria. No existe todavía una forma facilitada de este procedimiento y requiere personal muy cualificado de laboratorio para su realización.

II) Sistemas de adhesión agregación.

II.1) Tiempo de sangría. Es la única técnica de función plaquetaria *in vivo*. Es el tiempo que tarda en detenerse la hemorragia después de una pequeña incisión estandarizada en la cara anterior del brazo manteniendo una presión de 40 mm Hg. Este test da una idea global de la función plaquetaria en la hemostasia primaria, modificada por otras células sanguíneas y el endotelio. Ha sido ampliamente utilizada como prueba de función plaquetaria preoperatoria hasta los años 90. En la actualidad no es muy utilizado por su difícil estandarización y carácter invasivo. El tratamiento con aspirina alarga el tiempo de sangría por lo que se ha utilizado también para explorar la variabilidad individual de la respuesta farmacológica⁶⁵.

II.2) Impact Cone and Plate analyser (CPA, DiaMed, Switzerland). Mide adhesión y agregación de las plaquetas sobre a una superficie de poliestireno cuando la sangre interacciona a un flujo equivalente al arterial (1800/seg) durante 2 min. La adhesión y agregación se cuantifican mediante un analizador de imagen después de lavado y teñido de la muestra. La adhesión se expresa como porcentaje de la superficie plástica cubierta por plaquetas y la agregación como la medida del volumen de células adheridas. Se ha utilizado para monitorizar el efecto de antagonistas de GPIIb/IIIa⁶⁶ y el efecto protrombótico de los eritrocitos⁶⁷.

II.3) Platelet Function Analyzer (PFA-100®, Dade-Behring, Germany). Es un sistema que imita *in vitro* el tiempo de sangría. El sistema hace pasar sangre citratada a través de un capilar con alta velocidad de cizallamiento, hacia una pequeña apertura en una membrana recubierta de colágeno + epinefrina (CEPI) o colágeno + ADP (CADP). La función plaquetaria se monitoriza como el tiempo que tardan la sangre en ocluir la apertura en la membrana. Este sistema proporciona una evaluación global de la función plaquetaria que depende de procesos de adhesión-agregación y también del número de plaquetas, hematocrito, FvW, activación de GPIIb/IIIa, etc⁶⁸. Este sistema es también un “point of care” de fácil utilización. El cartucho CEPI se ha utilizado ampliamente para monitorizar el efecto de aspirina⁵⁷. Por el contrario el sistema PFA-100 con los cartuchos anteriores no puede el efecto de las tienopiridinas⁶⁴. Recientemente se ha hecho disponible un nuevo cartucho INNOVANCE PFA P2Y para monitorizar tienopiridinas⁶⁹.

III) Activación plaquetaria.

III.1) Citometría de flujo. El uso de la citometría de flujo permite medir, entre otros parámetros, la expresión en la membrana de la plaqueta de P-selectina (CD62) o el cambio conformacional del receptor GPIIb/IIIa con el anticuerpo PAC-1⁷⁰ y su modificación por los fármacos antiplaquetarios⁷¹. El uso de la citometría de flujo para el estudio de la activación plaquetaria representa un avance por la pequeña cantidad de muestra que se requiere, aunque necesita de un equipo caro y de personal entrenado. Para el estudio del efecto del clopidogrel por citometría de flujo se usa el ADP como agonista en presencia de PGE₁ y se monitoriza la fosforilación de la proteína intracelular VASP. En estas condiciones, la fosforilación de VASP (que se identifica con un anticuerpo monoclonal para la forma fosforilada en plaquetas permeabilizadas), es directamente proporcional al grado de inhibición del receptor P2Y₁₂.

III.2) Monitorización de la liberación de gránulos densos. Puede realizarse mediante marcaje isotópico de las plaquetas con ¹⁴C-5HT para monitorizar la secreción de serotonina⁴. La serotonina puede también cuantificarse por ELISA en liberados de activación plaquetaria. El ADP y ATP liberado por plaquetas activadas puede cuantificarse mediante cromatografía líquida de alta presión⁵ o por la reacción clásica del ATP con la luciferin-luciferinasa mediante métodos bioquímicos o usando el lumiagregómetro (Chronolog Corp, USA), que mide simultáneamente la agregación plaquetaria y la liberación de ATP.

III.3) Monitorización de la síntesis de TXA₂. La determinación del TXB₂, el metabolito estable del TXA₂ en las plaquetas es, en nuestra opinión, la medida más específica para controlar el efecto farmacológico de la aspirina. Puede realizarse en suero (en condiciones específicas de incubación inmediatamente después de su extracción a 37°C)⁷², lo que dificulta su uso práctico en pacientes que no acuden al laboratorio para la extracción de sangre, o en sangre total citratada estimulada con ácido araquidónico o colágeno. También se han determinado los metabolitos del TXA₂ en la orina. No obstante, en la orina, la presencia de metabolitos del TXA₂ puede tener su origen no sólo en las plaquetas sino también en otras células (riñón, leucocitos, etc.)⁷³. En nuestra opinión, la determinación del TXA₂ en sangre citratada estimulada con colágeno o ácido araquidónico es la más adecuada para determinar el efecto de la aspirina fuera de un laboratorio puramente experimental, sobre todo con colágeno si se utiliza la sangre total, ya que el ácido araquidónico podría ser utilizado por otras células capaces de metabolizar este compuesto, dando resultados muy orientativos pero menos específicos del TXB₂ de origen plaquetario, por lo que el ácido araquidónico es mejor usarlo para estimular plasma rico en plaquetas.

IV) Participación de las plaquetas en la generación de trombina.

Existen en la actualidad varias técnicas para medir el papel de las plaquetas en la generación de trombina, incluyendo la técnica original de Henker y Colaboradores⁷⁴ y el sistema facilitado de la misma como el sistema CAT (Calibrated Automated Thrombography)⁷⁵. Con este enfoque se han descrito modificaciones por el efecto de los fármacos antiplaquetarios^{76,77}.

La tromboelastografía, una técnica conocida desde hace más de 50 años, podría tener también utilidad en la monitorización del efecto de fármacos antiplaquetarios sobre la generación de trombina⁶⁴. La tromboelastografía proporciona información sobre la formación del coágulo (tiempo de latencia, velocidad, intensidad máxima) y la lisis del mismo. Además de los clásicos tromboelastógrafos (ROTEG, ROTEM) existen en la actualidad distintos equipos basados en tromboelastografía, más orientados a monitorizar el papel de las plaquetas y el efecto de fármacos antiplaquetarios en la formación del coágulo como el HemoStatus test (Medtronics blood Management) y el Platelet Mapping System (Haemoscope Corporation, USA).

Conclusiones y perspectivas de futuro.

El riesgo de recurrencia de enfermedades vasculares continúa siendo elevado a pesar de la terapéutica antiplaquetaria actualmente disponible. La respuesta funcional elevada en algunos paciente tratados podría ser un factor que contribuya a la recurrencia, como se ha comprobado en los estudios anteriormente mencionados. Pero los datos disponibles son todavía insuficientes para poder determinar con fiabilidad el impacto en la evolución clínica, y por tanto, actualmente no se recomienda la monitorización rutinaria de los fármacos antiplaquetarios en los pacientes. No obstante, es importante fomentar la investigación clínica y experimental en este ámbito por su carácter traslacional y potencial impacto en el tratamiento.

El caso de la variabilidad de respuesta al clopidogrel, está ampliamente admitido y las razones biológicas que lo sustentan, referidas anteriormente, están más claras y son biológicamente plausibles. En cambio, la resistencia a la aspirina sigue siendo un tema de abierta controversia, a pesar de que los datos disponibles aumentan y apoyan la existencia del fenómeno y su implicación clínica⁵⁵⁻⁵⁸.

Estos estudios están siendo controvertidos por la creencia de algunos líderes de opinión⁷⁸ de que la resistencia a aspirina es una entidad inexistente o muy infrecuente, ya que la aspirina siempre produce una inhibición adecuada de la síntesis de TXA2 y en los pacientes en los que no ocurre, es atribuible principalmente a la falta de seguimiento en el tratamiento. Respecto al efecto de bajas dosis de aspirina sobre la síntesis de TXA2 los estudios farmacológicos iniciales del Dr. Patrono y colaboradores, se realizaron en sujetos normales⁷⁹. No obstante parece plausible que pueda existir alguna diferencia entre el efecto de aspirina en sujetos normales y pacientes con enfermedad vascular⁸⁰. En los últimos años diversos grupos han demostrado una

inhibición insuficiente del TXA₂ en pacientes en tratamiento crónico con aspirina⁸¹⁻⁸⁴, antes de la intervención coronaria percutánea⁸⁵, en la cirugía de bypass⁸⁶ y en el síndrome coronario agudo^{59,87}. Aunque todavía no conocemos las bases biológicas de la inhibición insuficiente del TXA₂ por aspirina en los pacientes, no cabe duda científica de que es un fenómeno que se produce, lo que lleva asociado un incremento de todos los aspectos de función plaquetaria COX-1-dependientes, y por tanto siendo un fenómeno subyacente en los resultados de la monitorización de la función plaquetaria estudiada con otros test menos específicos⁸⁴.

Recientemente, en un estudio en 700 pacientes se ha asociado la inhibición insuficiente del TXA₂ a un aumento de eventos vasculares adversos⁸⁵.

En el tema de resistencia a fármacos antiplaquetarios debe considerarse en la actualidad con prudencia con prudencia, ya que son necesarios mas estudios para establecer, entre otras cosas : qué aspectos de la función plaquetaria y qué técnicas se asocian más a la recurrencia; cuales son los puntos de corte de buen/mal control con las distintas técnicas; conocer si el ajuste de dosis/pautas en pacientes poco respondedores aumenta el beneficio clínico del tratamiento; si la doble resistencia a aspirina y clopidogrel incrementa el riesgo o si esto puede paliarse en pacientes en situación de alto riesgo asociando un tercer fármaco antiplaquetario. Por eso, como se ha comentado, no existe actualmente un acuerdo internacional para la monitorización rutinaria del efecto de los fármacos antiplaquetarios. Finalmente, se están realizando estudios de investigación básica para detectar nuevas dianas farmacológicas y nuevos fármacos antiplaquetarios mas eficientes y/o complementarios a los ya disponibles⁸⁸, así como nuevos métodos de laboratorio que faciliten la monitorización de los efectos.

Agradecimientos

Grupo de investigación financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (PI07/0463), Programas Redes (Red RENEVAS RD06/0026)

Referencias

1. Santos MT, Valles J, Moscardo A. Mas alla de la hemostasia: papel de las plaquetas en procesos tromboinflamatorios. *Haematologica* (Edicion Española). 2009;94 (Extra 1):155-161.
2. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, et al. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:234-246.
3. Santos MT, Moscardó A, Vallés J, et al. Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal reorganization, alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation, and aspirin-insensitive mechanisms of thrombin-stimulated human platelets. *Circulation*. 2000;102:1924-1930.
4. Santos MT, Valles J, Marcus AJ, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. *J Clin Invest*. 1991;87:571-580.
5. Valles J, Santos MT, Aznar J, et al. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, ADP release, and recruitment. *Blood*. 1991;78:154-162.

6. Valles J, Santos MT, Marcus AJ, et al. Down regulation of human platelet reactivity by neutrophils -participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins. *Journal of Clinical Investigation*. 1993;92:1357-1365.
7. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Mar;28(3):s5-10. Epub 2008 Jan 3.; 2008.
8. Connors JJ, 3rd. Pharmacologic agents in stroke prevention, acute stroke therapy, and interventional procedures. *J Vasc Interv Radiol*. 2004 Jan;15(1 Pt 2):S87-101. *J Vasc Interv Radiol*. 2004 Jan;15(1 Pt 2):S87-101.
9. Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owren PA. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature*. 1961;192:531-532.
10. Cattaneo M. New P2Y(12) inhibitors. *Circulation*. 2010;121:171-179.
11. Siller-Matula JM, Krumphuber J, Jilma B. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical profile of novel antiplatelet drugs targeting vascular diseases. *Br J Pharmacol*. 2010;159:502-517.
12. Ueno M, Kodali M, Tello-Montoliu A, Angiolillo DJ. Role of Platelets and Antiplatelet Therapy in Cardiovascular Disease. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18:431-442.
13. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin JG, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation i. evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *Journal Biological Chemistry*. 1998;273:2024-2029.
14. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 2001;409:202-207.
15. Jin JG, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation II. the p2y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *Journal Biological Chemistry*. 1998;273:2030-2034.
16. Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood*. 2003;101:3908-3914.
17. Gurbel PA, Mahla E, Antonino MJ, Tantry US. Response variability and the role of platelet function testing. *J Invasive Cardiol*. 2009;21:172-178.
18. Angiolillo DJ, Bhatt DL, Gurbel PA, Jennings LK. Advances in antiplatelet therapy: agents in clinical development. *American Journal of Cardiology*. 2009;103:40A-51A.
19. Combescure C, Fontana P, Mallouk N, et al. Clinical implications of clopidogrel non-response in cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2010;8:923-933.
20. Geisler T, Gawaz M. Individualized antiplatelet therapy: what can a clinical score contribute? *Hamostaseologie*. 2009;29:360-367.
21. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J*. 2006;27:647-654.
22. Damani SB, Topol EJ. The case for routine genotyping in dual-antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:109-111.
23. Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, et al. Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation*. 2007 Feb 13;115(6):708-16. Epub 2007 Jan 29.; 2007.
24. Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J*. 2007;153:66.e69-16.
25. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, et al. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation* 2010;121:1188-1199.
26. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007;357:2001-2015.
27. Cannon CP, Harrington RA, James S, et al. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study. *Lancet*. 2010;375:283-293.

28. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest.* 1983;72:325-338.
29. Collier BS. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest.* 1997;100:S57-60.
30. Mascelli MA, Lance ET, Damaraju L, Wagner CL, Weisman HF, Jordan RE. Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation.* 1998;97:1680-1688.
31. Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004;126:234S-264S.
32. Hartman GD, Egbertson MS, Halczenko W, et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. *J Med Chem.* 1992 35:4640-4642.
33. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, et al. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem.* 1993;268:1066-1073.
34. Chew DP, Bhatt DL, Sapp S, Topol EJ. Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation.* 2001;103:201-206.
35. Hers I, Donath J, van Willigen G, Akkerman JW. Differential involvement of tyrosine and serine/threonine kinases in platelet integrin alphaIIb beta3 exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:404-414.
36. Wegener KL, Partridge AW, Han J, et al. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell.* 2007;128:171-182.
37. Moscardo A, Valles J, Pinon M, Aznar J, Martinez-Sales V, Santos M-T. Regulation of cytosolic PLA2 activity by PP1/PP2A serine/threonine phosphatases in human platelets. *Platelets.* 2006;17:405-415.
38. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest.* 1975;56:624-632.
39. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol.* 1991;68:11B-15B.
40. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72:2994-2998.
41. Vallés J, Santos MT, Aznar J, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood.* 2002;99:3978-3984.
42. Antithrombotic Trialists C. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Brit Med J.* 2002;324:71-86.
43. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation.* 2000;101:1206-1218.
44. Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M. Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart.* 1997;77:333-337.
45. Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 1998;97:716-720.
46. Santos MT, Valles J, Aznar J, Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB. Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity: Reduction by aspirin. *Circulation.* 1997;95:63-68.
47. Valles J, Santos MT, Aznar J, et al. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality : the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation.* 1998;97:350-355.
48. Santos MT, Vallés J, Aznar J, et al. Aspirin therapy for inhibition of platelet reactivity in the presence of erythrocytes in patients with vascular disease. *J Lab Clin Med.* 2006;147:220-227.

49. Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, et al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation*. 1995;91:2080-2088.
50. Karim S, Habib A, Levytoledano S, Maclouf J. Cyclooxygenases-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *Journal Biological Chemistry*. 1996;271:12042-12048.
51. Maclouf J, Folco G, Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost*. 1998;79:691-705.
52. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:2692-2696.
53. Grottemeyer KH. Effects of acetylsalicylic acid in stroke patients. Evidence of nonresponders in a subpopulation of treated patients. *Thromb Res*. 1991;63:587-593.
54. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, et al. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke*. 1994;25:2331-2336.
55. Snoep JD, Hovens MMC, Eikenboom JCJ, van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007;167:1593-1599.
56. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. Vol. 336. England; 2008:195-198.
57. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, de Gaetano G, Cerletti C. PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: A meta-analysis of 19 studies comprising 3,003 patients. *Thromb Haemost*. 2008;99:1129-1131.
58. Reny JL, De Moerloose P, Dautzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2008;6:444-450.
59. Valles J, Santos MT, Fuset MP, et al. Partial inhibition of platelet thromboxane A2 synthesis by aspirin is associated with myonecrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2007;99:19-25.
60. Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E, et al. Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol*. 2006;98:1156-1159.
61. Cardinal DC, Flower JR. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods*. 1980;3:135-.
62. Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, et al. Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. *Am J Clin Pathol*. 2009;131:834-842.
63. Wu KK, Hoak JC. A method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet*. 1974;2:924-926.
64. Price MJ. Bedside evaluation of thienopyridine antiplatelet therapy. *Circulation*. 2009;119:2625-2632.
65. Buchanan MR, Brister SJ. Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol*. 1995;11:221-227.
66. Varon D, Lashevski I, Brenner B, et al. Cone and plate(let) analyzer: monitoring glycoprotein IIb/IIIa antagonists and von Willebrand disease replacement therapy by testing platelet deposition under flow conditions. *Am Heart J*. 1998;135:S187-193.
67. Peerschke EI, Silver RT, Weksler B, Grigg SE, Savion N, Varon D. Ex vivo evaluation of erythrocytosis-enhanced platelet thrombus formation using the cone and plate(let) analyzer: effect of platelet antagonists. *Br J Haematol*. 2004;127:195-203.
68. Jilma B, Fuchs I. Detecting aspirin resistance with the platelet function analyzer (PFA-100). *Am J Cardiol*. 2001;88:1348-1349.
69. Linnemann B, Schwonberg J, Rechner AR, Mani H, Lindhoff-Last E. Assessment of clopidogrel non-response by the PFA-100 system using the new test cartridge INNOVANCE PFA P2Y. *Ann Hematol*. 2010;89(597-605).

70. Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1822-1834.
71. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol.* 2009;103:20A-26A.
72. Patrono C, Ciabattini G, Pinca E, et al. Low dose aspirin and inhibition of Thromboxane B2 production in healthy subjects. *Trombosis Research.* 1980;17:317-327.
73. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation.* 2002;105:1650-1655.
74. Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost.* 1995;74:134-138.
75. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32:249-253.
76. Butenas S, Cawthern KM, van't Veer C, DiLorenzo ME, Lock JB, Mann KG. Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation. *Blood.* 2001;97:2314-2322.
77. Wegert W, Graff J, Kaiser D, Breddin HK, Klinkhardt U, Harder S. Effects of antiplatelet agents on platelet-induced thrombin generation. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002;40:135-141.
78. Patrono C, Rocca B. Aspirin: promise and resistance in the new millennium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):s25-32. Epub 2008 Jan 3.; 2008.
79. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *Journal of Clinical Investigation.* 1982;69:1366-1372.
80. Sciulli MG, Renda G, Capone ML, et al. Heterogeneity in the suppression of platelet cyclooxygenase-1 activity by aspirin in coronary heart disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80:115-125.
81. Pulcinelli FM, Riondino S, Celestini A, et al. Persistent production of platelet thromboxane A2 in patients chronically treated with aspirin. *J Thromb Haemost.* 2005;3:2784-2789.
82. Maree AO, Curtin RJ, Dooley M, et al. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1258-1263.
83. Frelinger AL, 3rd, Furman MI, Linden MD, et al. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation.* 2006;113:2888-2896.
84. Santos MT, Valles J, Lago A, et al. Residual platelet thromboxane A2 and prothrombotic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with vascular disease. *Thromb Haemost.* 2008;6:615-621.
85. Frelinger AL, Li Y, Linden MD, et al. Association of cyclooxygenase-1-dependent and -independent platelet function assays with adverse clinical outcomes in aspirin-treated patients presenting for cardiac catheterization. *Circulation.* 2009;120:2586-2596.
86. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation.* 2003;108:542-547.
87. Santos MT, Fuset MP, Ruano M, Moscardo A, Valles J. Effect of atorvastatin on platelet thromboxane A(2) synthesis in aspirin-treated patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2009;104:1618-1623.
88. Barrett NE, Holbrook L, Jones S, et al. Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol.* 2008;154:918-939.

Tabla 1

Estrategias farmacológicas utilizadas para el control de la función plaquetaria.
• Modulación de la tasas de nucleotidos cíclicos
• Inhibición del efecto agonista del ADP
• Antagonistas del receptor GPIIbIIIa
• Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico
• Bloqueo del receptor del tromboxano
• Bloqueo del receptor PAR-1 de la trombina

Tabla 2.- Posibles condicionantes de la variabilidad a los fármacos antiplaquetarios

	ASPIRINA *	CLOPIDOGREL **
FACTORES CLÍNICOS Y FARMACOCINÉTICOS	<ul style="list-style-type: none"> - No prescripción - No seguir el tratamiento - Diabetes - Síndrome coronario agudo - Baja absorción - Interacciones con fármacos (anti-inflamatorios no esteroideos) 	<ul style="list-style-type: none"> - No prescripción - No seguir el tratamiento - Diabetes - Síndrome coronario agudo - Edad - Elevado índice de masa corporal. - Fallo renal. - Dosis insuficiente - Baja absorción - bajo metabolismo - Interacciones farmacológicas (Ca²⁺ antagonistas, inhibidores bomba de protones)
FACTORES CELULARES	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición insuficiente de COX-1 - Elevado turnover plaquetario - Sobreexpresión de la COX-2 - Activación plaquetaria inducida por eritrocitos - Incremento de catecolaminas - Generación de 8-iso-PGF_{2α} 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado turnover plaquetario - Aumento de la exposición a ADP - Elevación de las vías de activación: P2Y12 P2Y1 P2Y-independientes
FACTORES GENÉTICOS	<ul style="list-style-type: none"> - Polimorfismos de: <ul style="list-style-type: none"> - COX-1 - Receptor GPIIbIIIa - Receptor de FvW - Receptor P2Y1 	<ul style="list-style-type: none"> - Polimorfismos de: <ul style="list-style-type: none"> - Isoenzimas de CYP450 - Receptor GPIa - Receptor P2Y12 - Receptor GPIIbIIIa

* Wang TH y cols. Eu Heart J 2006; 27:647-654

** Geisler T and Gawaz. Haemostasiologic 2009; 29: 360-367