



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER I.A.P.
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

Estandarización de la prueba Resistencia a la Aspirina en el
laboratorio de Patología Clínica del Centro Médico ABC

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA

P R E S E N T A :

DRA. ROXANA CAROLINA TAMAYO GUTIÉRREZ

PROFESOR TITULAR DEL CURSO: DR. JESÚS SIMÓN DOMÍNGUEZ
ASESOR: DR. JESÚS SIMÓN DOMÍNGUEZ



MÉXICO, D.F.

OCTUBRE DE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. JOSÉ ELIZALDE GONZÁLEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR. JESÚS SIMÓN DOMÍNGUEZ
PROFESOR TITULAR Y ASESOR

AGRADECIMIENTOS

A mi maestro y asesor, Dr. Jesús Simón Domínguez, sus consejos son invaluable, muchas gracias por su paciencia y dedicación.

A mis maestros, Dr. Luis Carlos Moreno López, Dr. Pedro Álvarez Sánchez, Dr. José Gómez Vázquez, Dr. Gonzalo Álvarez Sánchez, Dr. Jesús Roy Aranda, Dra. Rosa Arias Marín y Dr. Juan Alberto de la Cruz Canché. Gracias por sus enseñanzas.

A todos los voluntarios que tan amable y desinteresadamente donaron parte de su ser, sin su participación la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A todo el personal del laboratorio de Patología Clínica y Banco de Sangre, en especial al departamento de Hematología que me brindó su apoyo incondicional.

A mis compañeras residentes por su amistad y comprensión.

DEDICATORIA

A Guillermo, mi amado esposo y a mis grandiosos padres Bety y Roberto.

ÍNDICE

	PAGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
A. Conceptos básicos	3
B. Patología	15
C. Antecedentes	23
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
V. HIPÓTESIS	27
VI. OBJETIVOS	28
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	29
A. Tipo de estudio	29
B. Universo y muestra del estudio	29
C. Criterios de inclusión, no inclusión y exclusión.	29
D. Procedimiento a seguir	30
E. Variables	33
F. Análisis estadístico	33
VIII. ASPECTOS ÉTICOS	34
IX. RESULTADOS	35
X. DISCUSIÓN	37
XI. CONCLUSIONES	39
XII. RECOMENDACIONES	41
XIII. BIBLIOGRAFÍA	42
XIV. ANEXOS	51
A. Historia Clínica	51
B. Carta de consentimiento bajo información	52
C. Tablas de resultados	54
D. Imágenes	56

RESUMEN

La aspirina ocupa un lugar importante entre los antiagregantes plaquetarios, por su acción antitrombótica; sin embargo, la resistencia a la aspirina es una patología que modifica de manera negativa el pronóstico de los pacientes que la padecen y la agregometría óptica con el ácido araquidónico como agonista es la prueba de laboratorio considerada el estándar de oro para la valoración *in vitro* del efecto antiagregante de la aspirina.

Objetivo: Cuantificar la respuesta a la medicación antiplaquetaria con aspirina en personas sanas, validar valores de referencia en población normal en nuestro laboratorio y conocer la variabilidad intraensayo de la Agregometría Óptica

Metodología: Estudio prospectivo en 40 voluntarios sanos, evaluados pre y post-administración de 160 mg de aspirina al día por 3 días mediante agregometría óptica con los agonistas ADP, ácido araquidónico, colágeno y epinefrina durante el periodo de Mayo-Agosto del 2007 en el Laboratorio de Patología Clínica del CMABC.

Resultados: Los valores de referencia para la agregometría óptica con ADP fueron: 38.85%, con AA en hombres de 66.97-95.13% y en mujeres de 64.52-116.68%, con colágeno 60.2-109.80% y con Epinefrina en hombres 69.88-94.12% y en mujeres 61.64-114.36%. La variabilidad intraensayo fue <10% con todos los agonistas.

Conclusiones: Se validaron valores de referencia, la agregometría óptica en nuestro laboratorio tiene una variabilidad intraensayo aceptable.

Palabras clave: Aspirina, Resistencia a la aspirina, agregometría óptica.

I. INTRODUCCIÓN

De los antiagregantes plaquetarios, la aspirina continua siendo considerada la piedra angular del manejo de pacientes con enfermedad cardiovascular¹⁻³ debido a su actividad antitrombótica^{4,5} la cual logra por la inhibición irreversible de la actividad de la COX-1, interrumpiendo la transformación del ácido araquidónico en sus derivados ciclooxygenados así como los mecanismos fisiopatológicos en los que éstos están implicados, a punto final reduce la producción de Tromboxano A₂ un potente vasoconstrictor y agonista plaquetario.^{6,7}

La aspirina tiene utilidad clínica en la enfermedad arterial coronaria y la enfermedad cerebrovascular, ya sea como terapia aguda o en la prevención primaria o secundaria.⁷ La dosis de efectividad antitrombótica de la aspirina varía de tan baja como 50mg/día a tan alta como 1500 mg/día.^{6,8,9} La inactivación completa de la COX-1 se logra con la dosis de 160mg/día; como las plaquetas no sintetizan nuevas proteínas la acción de la aspirina es permanente, persistiendo toda la vida de la plaqueta (7-10 días).¹⁰

A pesar del uso de la aspirina, un número considerable de pacientes sufre de eventos aterotrombóticos; debido a la sostenida incidencia de trombosis, el fenómeno de la variabilidad individual en la respuesta a la medicación antiplaquetaria ha cobrado gran interés, surgiendo así el término *resistencia a la aspirina*. Dicho término ha sido usado para describir diferentes fenómenos que incluyen la incapacidad de la aspirina para: 1) proteger a individuos de complicaciones tromboticas, 2) causar prolongación del tiempo de sangrado, 3) inhibir la biosíntesis de tromboxano A₂ ó 4) producir un efecto anticipado en uno

o más estudios de la función plaquetaria *in vitro*.¹¹ Existen factores clínicos, celulares y genéticos por los cuales se explica el fenómeno de variabilidad en la eficacia a la aspirina.¹² Desde el punto de vista de laboratorio existen diferentes pruebas para evaluar la eficacia de la aspirina, pero hasta ahora la agregación plaquetaria inducida por el agonista ácido araquidónico continua siendo el estándar de oro, a pesar de ser una prueba costosa y metodológicamente difícil de reproducir.¹³

La prevalencia real de la resistencia a la aspirina es desconocida, se manejan cifras de un 5% hasta un 61%;¹⁴ pero la importancia clínica de la resistencia a la aspirina sí se conoce y radica en mayor frecuencia de eventos isquémicos en pacientes tratados con aspirina post EVC,¹⁵ en usuarios de aspirina en forma preventiva mayor riesgo de muerte cardiovascular,¹⁶ aumento del riesgo combinado de muerte, IAM o EVC¹⁷ e influencia negativa de los resultados de los procedimientos de revascularización.^{18,19}

Por todo lo anterior, es importante detectar a aquellos pacientes con mala respuesta a la aspirina y debido a la ausencia de valores de referencia universales para identificar la respuesta o la no respuesta por medio del laboratorio, es necesario que cada laboratorio establezca los valores de referencia de los estudios que conseguirán este fin.

II. MARCO TEÓRICO

A) Conceptos Básicos

Estructura de la plaqueta

Las plaquetas son células pequeñas (aproximadamente 2-4µm de diámetro y 0.6-1.3µm de grosor), anucleadas, que derivan del citoplasma de los megacariocitos. Su desarrollo es controlado por la trombopoyetina al igual que muchas citoquinas y hormonas.²⁰ Las plaquetas circulan aproximadamente 10 días antes de ser removidas por los macrófagos, el número de plaquetas en la sangre varía entre $150-450 \times 10^9/l$.²¹

Las plaquetas se mueven en un campo eléctrico como si tuvieran una superficie con una carga negativa neta; los residuos de ácido siálico unidos a las proteínas y lípidos son los principales contribuidores de esta carga.²² La repulsión electrostática creada por la carga negativa de la superficie ayuda a prevenir que las plaquetas en reposo se unan con otras o con las células endoteliales (cargadas negativamente). La superficie de la plaqueta tiene una serie de indentaciones que se piensa son las aperturas del sistema canalicular abierto, un sistema de canales complicado compuesto por las invaginaciones de la membrana plasmática que se extiende a lo largo de la plaqueta.

Ultraestructuralmente las plaquetas se dividen en tres zonas bien diferenciadas con actividades funcionales específicas: periférica, intermedia y de organelos.

Zona periférica: Representa la parte más externa de las plaquetas y está formada por tres capas:²³ 1) el glucocálix o cubierta externa, es el responsable de la respuesta plaquetaria inicial a los estímulos externos, a través de

receptores glicoproteicos entre los que se encuentra el complejo glucoproteico Ib-IX con aproximadamente 25,000 moléculas sobre la superficie; su función primordial es permitir la adhesión de la plaqueta al subendotelio a través del Factor de von Willebrand (FvW), y el complejo Gp IIb/IIIa que se une al fibrinógeno y ADP, provoca cambio de forma, agregación y secreción plaquetaria; así mismo por medio del ADP participan otros agentes agregantes como adrenalina, serotonina, etc. La Gp V sirve como receptor de la trombospondina. Recientemente también se han identificado otros receptores para el tromboxano A₂, para la trombina (R1 y R2 de alta afinidad), que participan también como agregantes plaquetarios. Por otra parte, es rica en glucosiltransferasa, una octoenzima que reacciona con el grupo amino de la colágena transfiriendo residuos aminoazúcares, reacción que resulta importante para iniciar los fenómenos de adhesión y agregación plaquetaria. La membrana plasmática se invagina en múltiples ocasiones para formar lo que se conoce como el sistema canalicular abierto, estos canales incrementan notablemente el área de superficie plaquetaria que conecta la membrana con el citosol. 2) La membrana plaquetaria constituye la segunda capa de esta zona, también conocida como bicapa fosfolipídica, especialmente rica en ácido araquidónico. Ante la activación, la membrana expone una superficie cargada negativamente, indispensable para el soporte de los factores de la coagulación. 3) La capa más interna es la submembranosa donde se produce la transformación de las señales recibidas de la superficie externa. La zona periférica constituye una de las partes fundamentales en los mecanismos de activación, adhesión y agregación plaquetaria.

Zona intermedia o gel: Esta área de las plaquetas contiene las moléculas y estructuras que participan en la formación de las proteínas contráctiles y en la interacción con los microtúbulos. Así mismo, es primariamente responsable de la forma, tamaño celular y de la contracción que sigue de los procesos de adhesión y agregación que provocan la liberación de los compuestos intracelulares; además, también contiene la trombastenina, otra proteína contráctil de la plaqueta.

Zona de organelos: Aquí se encuentra el glucógeno y las mitocondrias además de los gránulos densos (que miden 200 a 300 nm con una zona central muy densa y un halo transparente, existiendo aproximadamente cinco por plaqueta), los gránulos alfa (los más numerosos, unos 50 por plaqueta; son esféricos u ovals y miden de 300 a 500 nm) y las lisosimas que contienen Beta glucorunidasa, fosfatasa ácida y catepsina. Por otra parte en esta zona se encuentran también los denominados sistemas membranosos de las plaquetas que consisten en el Sistema Canalicular Abierto (SCA) y el sistema tubular denso (STD). El sistema canalicular abierto está constituido por canales abiertos a la superficie plaquetaria; éstas son invaginaciones de la membrana plaquetaria que incrementan la superficie de contacto y permiten el intercambio de sustancias en zonas profundas de la plaqueta. El sistema tubular denso son canales de un contenido amorfo, de densidad similar al citoplasma y que no se comunica con el exterior y cuya función es servir de reservorio de calcio plaquetario y en él también se alojan las enzimas del metabolismo de las prostaglandinas.

Gránulos plaquetarios

Las plaquetas pueden producir cantidades muy pequeñas de proteínas, sus características citoplásmicas están determinadas por los megacariocitos de los que proceden. Existen cuatro categorías diferentes de gránulos que difieren en sus constituyentes internos y son producidos por los megacariocitos maduros: alfa (α), densos, y lisosomales.²⁴

Los gránulos α (azurófilos en las extensiones teñidas) son los más numerosos a la observación con el microscopio electrónico. Las principales funciones de los gránulos α son adhesión y reparación, contienen: 1) proteínas específicas de las plaquetas (factor 4 plaquetario, β -tromboglobulina), 2) glicoproteínas adhesivas (fibrinógeno, FvW, trombospondina, fibronectina y vitronectina), 3) Factores, co-factores e inhibidores de la hemostasis (fibrinógeno, factores V, VII, XI, XIII, proteína S, plasminógeno) 4) Factores mitogénicos y angiogénicos (factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento vascular endotelial, factor de crecimiento transformador β , 5) Receptores (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP VI, PECAM) y otras proteínas (albúmina, inmunoglobulinas, P-selectina).

Los *gránulos densos* se distinguen por su morfología y su contenido (un depósito no metabólico de nucleótidos de adenina sintetizado por los megacariocitos, calcio y serotonina), su principal función es secreción de factores pro-agregantes, los gránulos densos contienen: 1) gránulos mayores (ADP, ATP, serotonina, histamina, calcio y magnesio) y 2) componentes granulares de membrana (P-selectina, y receptores como GP IIb/IIIa, GP Ib).

Los gránulos lisosomales son una clase única de gránulos en función de su localización histoquímica ultraestructural de arilsulfatasa y fosfasa ácida, la inmunolocalización de catepsina D y la identificación de una proteína de membrana asociada al lisosoma. Se originan muy pronto durante la maduración, antes de la aparición de los gránulos α , su función consiste en proveer de factores de limpieza.

Funciones de la plaqueta

Las funciones principales de las plaquetas incluyen la hemostasis normal así como la vasoconstricción y reparación del vaso dañado. Trombosis, inflamación, crecimiento tumoral y promoción de la aterosclerosis son otros procesos fisiopatológicos en los que participan las plaquetas.²⁵

Para cumplir su función principal de sellar las aperturas en el árbol vascular, las plaquetas experimentan una serie de pasos que incluyen la activación, adhesión y agregación plaquetaria.

Activación Plaquetaria

Se entiende por activación plaquetaria al cambio de forma de la plaqueta de disco a forma esférica con largas extensiones dendríticas, este cambio se debe a la actina y miosina en el citoplasma de la plaqueta, lo que incrementa considerablemente la superficie de contacto con otras plaquetas.²¹ Durante el cambio de forma los gránulos secretores son organizados en el centro de las plaquetas liberando su contenido al plasma durante la activación y reforzándola más.²⁴ Las plaquetas se activan bajo numerosos estímulos tanto físicos como

químicos: cambios en la velocidad del flujo sanguíneo y turbulencias, así como catecolaminas, tromboxano A_2 , colágeno, lesión vascular, activación de la coagulación plasmática, activación por otras plaquetas, etc.²⁶

Adhesión plaquetaria

Este proceso comprende el transporte por difusión de las plaquetas hacia la superficie reactiva y la interacción de los receptores de la membrana plaquetaria con sus ligandos en las estructuras de la pared lesionada. Entre las proteínas adhesivas de la matriz se incluyen el colágeno, la fibronectina, el FvW, la vitronectina y la tromboespadina.²⁶ Las plaquetas no se adhieren a las células vasculares endoteliales normales, pero en áreas de disrupción endotelial sí lo hacen a varios componentes del tejido conectivo subendotelial. En los segundos siguientes a la lesión, las plaquetas se adhieren a las fibrillas de colágena específico para las plaquetas y presente en su estructura terciaria.²⁷ Dicho receptor es la GP Ia/IIa. Esta interacción está estabilizada por el FvW, una glicoproteína adhesiva que permite a las plaquetas permanecer unidas a la pared del vaso a pesar de las elevadas fuerzas tangenciales que se generan en el interior de la luz vascular como consecuencia de altas velocidades de cizalladura. El FwV realiza esta función formando un enlace entre un receptor plaquetario situado en la glicoproteína Ib/IX y las fibrillas de colágena subendoteliales. Por otro lado el receptor plaquetario glicoproteína IIb/IIIa (fundamental para la agregación plaquetaria), también participa en la adhesión plaquetaria, sobretodo en condiciones de alta velocidad de cizalladura local, ligándose al FvW. Una vez adheridas al subendotelio, las plaquetas se

extienden sobre la superficie y plaquetas adicionales aportadas por el flujo sanguíneo se unen, primero a la placa de plaquetas adheridas y, eventualmente, una a otra formando las masas de agregados plaquetarios.²⁸

Agregación plaquetaria

La trombina, el ADP, la adrenalina, el colágeno y el ácido araquidónico son agonistas de la agregación plaquetaria con mayor relevancia fisiológica. Existen receptores específicos en la superficie plaquetaria para cada uno de los agonistas y dichos receptores están enlazados a estructuras intracelulares, cuya alteración por los complejos receptor-agonista, conduce a cambios intracelulares que caracterizan a la plaqueta activada.²⁹ La unión de agonistas tales como adrenalina, colágeno o trombina a receptores de la superficie de las plaquetas, activa dos enzimas de la membrana: fosfolipasa A₂ y fosfolipasa C. La activación de la fosfolipasa A₂ conlleva a la liberación de ácido araquidónico libre que se convierte por medio de la ciclooxigenasa en endoperóxidos de prostaglandinas, para formar por último el potente agregante plaquetario tromboxano A₂ (TxA₂), así como prostaglandinas estables como la PGD₂ que también inhibe la agregación plaquetaria. El TxA₂ tiene actividad ionofórica, facilitando el transporte de calcio a través de las membranas intercelulares, con redistribución del calcio hacia el citoplasma. La activación de la fosfolipasa C produce la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4.5 bifosfato (PIP₂), liberando diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP₃). El IP₃ interviene en el movimiento de calcio dentro del citosol plaquetario y estimula la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina. Esta última interactúa con la

actina para facilitar el movimiento de los gránulos y el cambio de forma de las plaquetas. El DAG activa la protein-cinasa C que, a su vez, fosforila una proteína que pudiera servir para regular la secreción de los gránulos plaquetarios. Existe, finalmente, un mecanismo equilibrado que controla la velocidad y la extensión de la activación plaquetaria. El TxA_2 aumenta la actividad de la fosfolipasa C, que estimula la activación y la secreción plaquetaria. En cambio, la prostaciclina PGI_2 , un producto del ácido araquidónico de las células endoteliales, inhibe la activación de las plaquetas mediante la elevación de los niveles intraplaquetarios de AMP cíclico.

Aspirina

La aspirina fue sintetizada en 1897 por Felix Hoffman, a 110 años de su descubrimiento ocupa una posición importante como agente antiagregante plaquetario.³⁰ El efecto antiplaquetario de la aspirina fue descrito por primera vez por Morris en 1967; la acción antiplaquetaria de la aspirina se atribuye principalmente a la inhibición irreversible de la actividad de la ciclooxigenasa por acetilación del grupo hidroxilo-serina de dicha enzima,³¹ de esta forma se interrumpe la transformación del ácido araquidónico en sus derivados ciclooxigenados así como los mecanismos fisiopatológicos en los que éstos están implicados, reduciéndose la producción de tromboxano A_2 (TxA_2).³² Como las plaquetas son células anucleadas y por tanto incapaces de llevar a cabo la síntesis proteica, no pueden reponer la actividad enzimática, este efecto dura toda la vida de la plaqueta, de 4 a 7 días.

Además de inhibir la síntesis de TxA_2 , la aspirina inhibe la formación de prostaciclina por las células endoteliales. Las células del endotelio vascular, en contraste con las plaquetas, pueden recuperarse de la inhibición de la ciclooxigenasa inducida por la aspirina por síntesis de novo de la enzima. La acción sobre la ciclooxigenasa del endotelio vascular requiere más dosis de aspirina y se ha postulado que su efecto puede ser transitorio.³³

Otros efectos no relacionados a la inhibición de TxA_2 son: alargamiento de la fibrinólisis, supresión de la coagulación plasmática y efectos antiinflamatorios. El alargamiento de la fibrinólisis es causada por efecto de N-acetilación sobre los residuos del fibrinógeno³⁴ y la supresión de la coagulación puede ser causada por la disminución de la cantidad de vitamina K (observada después de la administración de grandes dosis >1500 mg/día), por inhibición de la generación de trombina (dosis >500 mg/día) ó por la acetilación de uno o más de los factores de la coagulación.³⁵ Los efectos anti-inflamatorios de la aspirina no son sólo debidos a la inhibición de la actividad de la COX-2 sino que la aspirina también modifica la interacción tanto en las plaquetas como en los neutrófilos y eritrocitos, protege a las células endoteliales del estrés oxidativo y mejora la disfunción endotelial.³⁶

La aspirina es rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal alto, lo que se demuestra por una inhibición de la función plaquetaria a los 60 minutos de la toma. Este efecto antiplaquetario es asociado con prolongación del tiempo de sangrado e inhibición de TxA_2 dependiente de la agregación plaquetaria. Estos efectos ocurren aún antes de que el ácido acetilsalicílico sea detectable en sangre debido a la exposición de las plaquetas a la aspirina en la circulación

portal.³⁷ La capa entérica de la aspirina retrasa su absorción significativamente.^{38,39} La vida media de la aspirina a nivel plasmático es sólo de 20 minutos; sin embargo, ya que las plaquetas no pueden generar nueva actividad COX, los efectos de la aspirina duran toda la vida de la plaqueta (10 días). Después de una dosis única de aspirina, la actividad plaquetaria de la COX se recupera en un 10% por día hasta que la función de las plaquetas se recupera.⁴⁰ A pesar de que toma 10 días para que la población total de plaquetas sea renovada, y por lo tanto tengan actividad COX normal, se ha demostrado que con tan sólo el 20% de plaquetas con actividad COX normal se logra hemostasia normal.⁴¹

La dosis de aspirina requerida para obtener adecuada inhibición plaquetaria ha sido estudiada intensivamente. Una dosis única de 100 mg es efectiva para abolir la producción de TxA₂ en individuos normales, al igual que en pacientes con enfermedad aterosclerótica.⁴²⁻⁴⁴ Dosis únicas menores a 100mg resultan en un efecto dosis dependiente en la producción de TxA₂; el efecto de dosis repetidas es acumulativo, a pesar de que se requiere más de 24 horas para lograr inhibición máxima de la COX.⁴⁵

Los beneficios terapéuticos en enfermedades cardiovasculares han sido demostrado con dosis que van de 30-1500mg/día, dosis más altas no han mostrado mayor efectividad pero si pueden incrementar el riesgo de efectos adversos de sangrado gastrointestinal alto.^{1,9}

La aspirina ha sido evaluada en 6 ensayos de **prevención primaria** (US Physicians, Primary Prevention Project, Hipertensión Optimal Treatment, UK Doctors, Trombosis Prevention Trial and Swedish Angina Pectoris Aspirin Trial)

que incluyeron sanos, hipertensos y pacientes con alto riesgo y angina estable. Estos ensayos demostraron que el nivel de riesgo cardiovascular es el mayor determinante del beneficio absoluto de la terapia con aspirina, el uso de la aspirina es recomendado solamente si el riesgo para evento coronario en un pacientes es mayor de 1.5% anual.⁴⁶⁻⁴⁸

En cuanto a la **prevención secundaria**, se ha demostrado reducción del 20-25% de riesgo en eventos adversos al usar aspirina a largo plazo en pacientes con eventos aterotrombóticos previos u otra categoría de alto riesgo.⁴ En un gran meta-análisis la medicación antiplaquetaria fue asociada con la disminución de reinfartos, muerte y embolia en 18,888 pacientes con historia de infarto al miocardio, 18,270 pacientes con historia de eventos cerebrovasculares y 9214 pacientes con enfermedad arterial periférica. La angioplastía coronaria por vía transluminal percutanea y la implantación de stent intracoronario resultan en trauma vascular local, con exposición del subendotelio al espacio vascular. Esta altamente trombogénica terapéutica predispone al desarrollo de trombo intraluminal con cierre abrupto o trombosis subaguda del vaso en 3.5-8.6% de los procedimientos.^{49,50} Varios estudios han demostrado una disminución significativa en las complicaciones agudas de la angioplastía con la combinación de aspirina y dipiridamol,⁵¹ aunque esta combinación provee un pequeño beneficio adicional sobre la aspirina sola. La cirugía de bypass arterial coronario con injerto de vena safena esta asociada con 5-15% de oclusión del injerto en el primer mes posoperatorio, cuando se prescribe en el periodo posoperatorio inmediato, la aspirina disminuye claramente el rango de oclusión

trombótica temprana del injerto al 50% y la terapia continuada con aspirina por un año disminuye a futuro el rango de eventos oclusivos.^{52,53}

El efecto antitrombótico de la aspirina ha sido bien establecido, por lo que su uso en la **Terapia aguda** de la enfermedad coronaria es vital. The Second International Study of Infarct Survival (ISIS-2)⁵⁴ probó la eficacia de la dosis única de 162.5mg al momento de los síntomas coronarios agudos en la prevención de eventos aterotrombóticos futuros, la reducción del riesgo proporcional de eventos adversos fue de 30%. Al mismo tiempo el tratamiento mostraba ser seguro ya que no aumentaban las complicaciones de sangrados mayores y el beneficio se mantenía a 10 años de seguimiento.⁵⁵ La eficacia de la aspirina en EVC ha sido también establecida con una disminución del riesgo del 11%. En un meta-análisis de 40,821 pacientes con EVC hubo una significativa reducción de nuevos eventos vasculares cerebrales así como de muerte cardiovascular.⁴

La mayoría de los efectos adversos de la aspirina se debe a su efecto de inhibición de la síntesis de prostaglandinas a nivel de las células de la mucosa gastrointestinal y son dosis dependiente. La incidencia de sangrado intestinal se asocia con altas dosis del fármaco (>325mg/día); el sangrado importante con menores dosis suele aparecer si coexisten lesiones gástricas o administración concomitante de AINES.⁹ Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de complicaciones digestivas son la presencia de historia ulcerosa o de hemorragia digestiva previa, así como la infección por *Helicobacter pylori*; el paciente que presente uno de estos factores de riesgo deberá recibir terapia profiláctica gastroduodenal. De igual manera, se considera necesaria la

profilaxis en pacientes, que sin presentar estos factores de riesgo, sufren de alguna enfermedad concomitante grave, donde la aparición de una hemorragia digestiva pueda poner en riesgo la vida.⁵⁶

El uso regular de AINES puede incrementar el riesgo de enfermedad renal crónica en grupos de alto riesgo y alterar el control de la presión sanguínea en pacientes con hipertensión arterial.⁵⁷ Este efecto parece ser relacionado a la capacidad de la mayoría de los inhibidores de prostaglandinas G/H sintetasa para reducir la síntesis renal del vasodilatador prostaglandina.

B) Patología

Variabilidad en la eficacia a la aspirina: Resistencia a la aspirina

A pesar de que la aspirina ha demostrado disminuir eventos aterotrombóticos en pacientes de alto riesgo, un número considerable de pacientes sufren eventos cardiovasculares a pesar del uso de ésta; por otro lado la respuesta al tratamiento con la aspirina varía individualmente según mediciones por diferentes pruebas de función plaquetaria.⁵⁸⁻⁶⁰ Hace algunos años surgió el término “**resistencia a la aspirina**” que ha sido usado para describir diferentes fenómenos que incluyen la incapacidad de la aspirina de: 1) proteger a los individuos de complicaciones trombóticas; 2) prolongar el tiempo de sangrado; 3) reducir la producción de TXA₂ ó 4) producir un efecto anticipado en una o más pruebas *in vitro* de la función plaquetaria.¹¹ De lo anterior podemos decir que la resistencia a la aspirina engloba tres grandes ámbitos: el clínico, el farmacológico y el funcional.

La resistencia clínica a la aspirina alude al hecho que algunos pacientes experimenten eventos vasculares recurrentes a pesar de la terapia a largo plazo con aspirina y debe ser más apropiadamente llamado **falla al tratamiento** que resistencia a la aspirina, la falla al tratamiento es un fenómeno común que ocurre con todas las drogas,¹¹ dada la naturaleza multifactorial de la aterotrombosis, no es sorpresa que sólo una fracción (usualmente un cuarto o un tercio) de todas las complicaciones vasculares puedan ser prevenidas con una sola estrategia preventiva.

El término **resistencia farmacológica a la aspirina** deriva de la falla de la aspirina para inhibir la producción de TxA₂. La aspirina al inhibir la actividad de la COX-1 (que normalmente se convierte en los precursores de TxA₂ (prostaglandina G₂/H₂) debería prevenir o significativamente disminuir la formación de TxA₂. Hasta ahora, la producción de TxA₂ ha sido medida del suero, plasma u orina con la ayuda de metabolitos estables de TxB₂ y 11-dehidro TxB₂ para diagnosticar la resistencia a la aspirina. En estos casos, los sujetos definidos como resistentes a la aspirina son aquellos con niveles incrementados de TxB₂ en plasma, suero u orina a pesar del tratamiento con aspirina. Este tipo de resistencia a la aspirina ha sido llamada resistencia farmacológica a la aspirina.

El término **resistencia funcional a la aspirina** es dado a la actividad plaquetaria aumentada a pesar del tratamiento con aspirina que se mide por pruebas de laboratorio que evalúan la función plaquetaria.⁶¹ La agregometría plaquetaria inducida por ácido araquidónico ha sido históricamente propuesta

como el estándar de oro para definir resistencia a la aspirina y todavía continua siendo el método más ampliamente utilizado.¹⁴

La prevalencia de resistencia a la aspirina ha sido estimada entre 5.5-61%,^{14,62} este amplio rango se explica por la falta de estudios controlados y la variedad de métodos de análisis utilizados, todo esto hace que se desconozca la magnitud del problema.

Se han propuesto diferentes mecanismos o factores por los cuales se explica la resistencia a la aspirina que pueden ser clasificados en:

- Clínicos (no apego al tratamiento, interacciones con otras drogas, subdosificaciones, no absorción de la aspirina, hipercolesterolemia, hiperglicemia, diabetes, tabaquismo)^{12,63-67}
- Celulares (vías alternas para la producción de TxA₂: Supresión insuficiente de la COX-1, sobreexpresión de la COX-2, Fuentes extra-plaquetarias de TxA₂, Generación de 8-iso-PGF. Vías alternas para la activación plaquetaria: sobrerregulación de TxA₂ de vías independientes como trombina, ADP, colágeno, falla en la inhibición de catecolaminas mediada por la activación plaquetaria.^{68,69}
- Genéticos (polimorfismos de la COX-1, polimorfismos de los receptores GP IIb/IIIa, polimorfismos del receptor de colágeno, polimorfismos de los receptores del FvW).⁷⁰⁻⁷⁴

A lo largo de los años se ha demostrado que la importancia clínica de la resistencia a la aspirina radica en:⁷⁵

- Mayor frecuencia de eventos isquémicos en pacientes tratados con aspirina post EVC.¹⁵
- En usuarios de aspirina en forma preventiva mayor riesgo de muerte cardiovascular.¹⁶
- Hay aumento del riesgo combinado de muerte, IAM o EVC.^{17,76}
- E influencia negativa de los resultados de los procedimientos de revascularización.^{18,19,77}

Pruebas de laboratorio para evaluar la función plaquetaria: pruebas de monitoreo de la terapia antiplaquetaria con aspirina

Existen varias técnicas para medir la función plaquetaria, éstas se han utilizado principalmente para evaluar defectos de la función plaquetaria y la tendencia a hemorragia previa a una cirugía. Sin embargo, debido al papel tan importante que las plaquetas juegan en el desarrollo de la aterotrombosis⁷⁸ (causa líder de mortalidad en los países de Occidente) algunas pruebas de la función plaquetaria han tenido gran aplicación en enfermedad aterotrombótica para predecir consecuencias clínicas y monitorear el efecto de las drogas antiplaquetarias.^{79,80} Cabe mencionar que todas las técnicas de medición de la activación y agregación plaquetaria son sensibles a diversas variables como son flebotomía, anticoagulación, transporte de la muestra y manejo de la muestra por parte del laboratorio.⁸¹ En el siguiente cuadro se resumen las pruebas de laboratorio utilizadas más comúnmente para el estudio de la resistencia a la aspirina (tomado y modificado de la publicación: *Aspirin*

resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance en el Journal of Trombosis and Haemostasis, 2005).⁸²

NOMBRE DE LA PRUEBA	BASES DE LA PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Cuantificación urinaria de Tromboxano B₂	Inmunoensayo de 11-dehydrothromboxano B ₂	Depende directamente de la COX-1 Refleja la producción <i>in vivo</i> de tromboxano	Depende de la función renal No específico para plaquetas Sensibilidad incierta No está ampliamente evaluado
Agregometría por impedancia con ADP y colágeno	Agregación de plaqueta a plaqueta	Requiere menor cantidad de muestra Muestra de sangre total	No específica Sensibilidad incierta Experiencia del operador
Agregometría Óptica con AA y ADP	Agregación de plaqueta a plaqueta	Estándar de oro tradicional Correlaciona con eventos clínicos	Limitada reproducibilidad Consume tiempo Requiere alto volumen de muestra Costosa No estandarizada Experiencia del operador
PFA-100	Detención <i>in vitro</i> del flujo sanguíneo de high shear mediante formación del tapón plaquetario	Simple Rápido Bajo volumen de muestra La muestra no requiere preparación Ensayo en sangre total	Depende del FvW, hematocrito No específico No hay ajuste del instrumento

Cuadro 1: Pruebas de laboratorio comúnmente usadas para medir el efecto antiplaquetario de la Aspirina.

Cuantificación urinaria de Tromboxano B₂

Los niveles de tromboxano han sido sugeridos como indicadores del efecto de la aspirina. La producción de Tromboxano A₂ puede ser determinada mediante la cuantificación de sus metabolitos estables como es el tromboxano B₂ en

orina (11-dehydrothromboxano B₂ ó 11-DHTxB₂).⁸³ Utilizando el método de ELISA, un anticuerpo monoclonal contra el 11-DHTxB₂ reconoce su forma acíclica; después de la administración de aspirina los niveles del 11-DHTxB₂ en la orina humana declinan de 3.9-5.4 ng/ml a 0.4-1.6ng/ml después de 6 horas.⁸⁴ Sin embargo entre las limitaciones de esta prueba se encuentran: 1) que los niveles urinarios de TxB₂ pueden provenir de monocitos y macrófagos circulantes que producen tromboxano A₂ dentro de la placa aterosclerótica⁸⁵ y 2) depende de la función renal;⁸⁶ por lo tanto la cuantificación urinaria del Tromboxano B₂ no es específica para la aspirina.

Agregometría por impedancia con ADP y colágeno

Es una prueba realizada en sangre total, evitando así la preparación de la muestra por medio de centrifugación y consumiendo menos tiempo en su procesamiento. La técnica por impedancia mide el incremento progresivo de la impedancia eléctrica entre dos electrodos, al adherirse y agregarse las plaquetas en ellos con la adición de ADP y colágeno como agonistas.⁸⁷

El método de impedancia es muy lento y requiere estandarización del hematocrito, y a menudo utiliza concentraciones muy altas de agonistas no fisiológicos. Esta técnica no es específica para la evaluación de la eficacia de la aspirina pero permite el estudio de otras drogas antiplaquetarias como el dipiridamol y el de muestras trombopénicas con cuentas plaquetarias tan bajas como de $50 \times 10^9/l$.⁸⁸

Agregometría óptica con ácido araquidónico y ADP

Las plaquetas se agregan bajo una variedad de condiciones y en la presencia de un número de diferentes reactivos. Se requiere de la separación por centrifugación del plasma rico en plaquetas (PRP) de sangre total anticoagulada con citrato de sodio. El fenómeno de agregación puede inducirse en el PRP mediante la adición de agonistas (colágeno, ADP, epinefrina, ácido araquidónico)⁸⁸⁻⁹⁰ este fenómeno también depende de la presencia de calcio, fibrinógeno y uno o más factores plasmáticos, por lo tanto la prueba debe realizarse en un lapso no mayor de 3 horas de recolectada la muestra. Se utiliza un agregómetro óptico basado en el método turbidimétrico de Born⁹¹ donde la activación y agregación plaquetaria son medidas por el incremento de la transmisión de la luz a través de la solución de PRP, las cuales están dispersas en el plasma y ya en las cubetas se amontonan. Los cambios de la transmisión de la luz son grabados en un tiempo total de 7 minutos. (Ver Imágenes 1-6)

La utilización del ADP y el ácido araquidónico para el monitoreo de la eficacia radica en: 1) el ADP se une a un receptor específico de membrana asociada con el complejo de glicoproteínas GPIIb/GPIIIa e iones extracelulares de calcio, nos ayuda a descartar la presencia de varias anomalías congénitas de las plaquetas, la ingestión de grandes cantidades de alcohol y la ingestión de otras drogas antiagregantes plaquetarias y 2) el ácido araquidónico es específico para la evaluar la eficacia a la aspirina ya que mide directamente la capacidad de la COX-1 para producir TxA₂ subsecuente a la agregación plaquetaria.

A pesar de ser una prueba que consume tiempo, que es laboriosa y que requiere de un operador experimentado, la agregometría óptica es considerada

hasta el momento como el estándar de oro en la evaluación de la función plaquetaria por la correlación con eventos clínicos que ofrece.¹⁷

PFA-100

Su nombre proviene del inglés Platelet Function Analyser-100, este es un microprocesador de sistema de cartuchos diseñado para proveer una medición cuantitativa *in vitro* de la adhesión y agregación plaquetaria en sangre total bajo condiciones de alto flujo.^{92,93} El sistema usa muestra de sangre total anticoagulada con citrato de sodio al 3.2% que es aspirada a 5000-6000s a través de una apertura (aproximadamente 150µm de diámetro) hacia una membrana cubierta de con colágeno ya sea acompañado de ADP (Colágeno/ADP) o epinefrina (colágeno/epinefrina).

Se mide el tiempo en que las membranas de obturan (tiempo de obturación) y se reporta en segundos. Se ha considerado al PFA-100 como método para el monitoreo del efecto antiplaquetario de la aspirina,⁹⁴ el tiempo de obturación del cartucho de colágeno/epinefrina debe estar prolongado en pacientes tratados con aspirina. Al depender del hematocrito y el Factor de von Willebrand⁹⁵ (elevado en pacientes con enfermedad cardiovascular y diabetes) el PFA-100 no es considerado específico para la aspirina. (Ver imagen 7)

Tratamiento de la resistencia a la aspirina

El tratamiento de la resistencia a la aspirina es desconocido, los pacientes que han experimentado un evento vascular recurrente a pesar del tratamiento con aspirina requieren de una reevaluación para encontrar la posible causa (apego

al tratamiento, interacción con otras drogas, etc). Existen otras drogas alternativas a considerar en el manejo de pacientes resistentes a la aspirina como son: bloqueadores de los receptores de ADP (clopidogrel)^{96, 97} ó inhibidores de la fosfodiesterasa (dipiridamol).¹⁴

C) Antecedentes

A pesar de que las plaquetas fueron identificadas por primera vez hace más de 120 años como corpúsculos en la sangre por medio de microscopía, la aplicación de rutina del conteo plaquetario y extendidos sanguíneos para el estudio de la morfología plaquetaria fue ampliamente utilizada hasta los años cincuenta. El microscopio de contraste de fase fue el primer método utilizado para cuantificar plaquetas en muestras de sangre lisadas.⁹⁸ Posteriormente la cuantificación plaquetaria revolucionó con la invención del Coulter o principio de impedancia en los años cincuenta.⁹⁹ Una biometría hemática completa que incluía conteo plaquetario con la medición de otros parámetros importantes como el volumen plaquetario medio y ancho de distribución plaquetaria estuvo disponible por primera vez hasta los años setenta.¹⁰⁰

Las pruebas de la función plaquetaria empezaron con la aplicación del tiempo de sangrado *in vivo* de Duke en 1910. El tiempo de sangrado fue posteriormente refinado por la técnica de Ivy y la disponibilidad del template comercial y todavía en los noventa era considerado la prueba más útil para medir la función plaquetaria.¹⁰¹ Durante los últimos 15 años el amplio uso del tiempo de sangrado declinó rápidamente debido al reconocimiento de sus limitaciones y al surgimiento de otras pruebas menos invasivas.¹⁰²

La agregometría óptica (agregometría por transmisión de luz) fue inventada en los años sesentas y pronto revolucionó la identificación y el diagnóstico de los defectos hemostáticos primarios.¹⁰³ La agregometría óptica todavía es considerada como el estándar de oro de las pruebas de función plaquetaria; al agregar un panel de agonistas a un rango de concentración a un pull de plaquetas. Recientemente se han fabricado agregómetros más fáciles de usar, con capacidad de multicanal, con líneas de base simples y automáticas que van del 0 al 100% con operación por medio de computadora y almacenamiento de resultados.

III. JUSTIFICACIÓN

Mediante la utilización de agregometría óptica en voluntarios sanos podremos validar valores de referencia normales para dicho estudio y estandarizar la prueba de la resistencia a la aspirina.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta antiplaquetaria a la medicación con aspirina es variable y la agregometría óptica mediante el ácido araquidónico como agonista continua siendo el estándar de oro para la valoración *in vitro* del efecto antiplaquetario de dicho fármaco. La presencia de resistencia a la aspirina es de suma importancia clínica en los pacientes con enfermedad cardiovascular. Sin embargo, la forma adecuada para definir ó determinar la presencia a la resistencia a la aspirina continúa siendo tópico evasivo que llama la atención de la comunidad médica. Es importante que cada laboratorio establezca la metodología a seguir en el estudio de la respuesta a la aspirina por medio de agregometría óptica y así establecer los valores de referencia en una población normal para poder posteriormente definir parámetros de anormalidad.

V. HIPÓTESIS

Es posible cuantificar la respuesta *in vitro* a la medicación antiplaquetaria con aspirina en personas sanas mediante la utilización de estudios de agregometría óptica.

VI. OBJETIVOS

- Cuantificar la respuesta a la medicación antiplaquetaria con aspirina en personas sanas.
- Validar valores de referencia en población normal en nuestro laboratorio.
- Conocer la variabilidad intraensayo de la Agregometría Óptica.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

A) Tipo de estudio: analítico, prospectivo, de estudios diagnósticos

B) Universo y muestra de estudio: voluntarios sanos evaluados pre y post-administración de aspirina en el laboratorio del CMABC en el periodo de 01 Mayo -31 julio del 2007.

C) Criterios de inclusión, no inclusión y exclusión:

Inclusión: se incluyeron a 40 voluntarios sanos (NCCLS recommendations for establishing a normal reference range) comprobados bajo historia clínica (ver anexo)

Los voluntarios fueron:

- 50% y 50% de ambos sexos.
- Mayores de edad.
- No fumadores.
- Sin antecedentes de ingestión de ningún medicamento al menos 2 semanas antes del estudio.
- Con parámetros hematológicos normales (Hct 37-47%, Plaquetas 150,000-450,000/mm³ Eritrocitos 4.25-6 millones/ μ l).

No inclusión en aquellos voluntarios que referían:

- Antecedente personal o familiar de enfermedades hereditarias de la función plaquetaria.
- Antecedente personal de síndromes mieloproliferativos.

- Paraproteinemias malignas.
- Antecedente personal de gastritis.
- Antecedente personal de infarto al miocardio, angina estable, angina inestable, insuficiencia cardiaca, EVC.
- Diabetes.
- Uso de antiinflamatorios no esteroideos (COX-1 y COX-2) 3 semanas previas al inicio del estudio.
- Tabaquismo.
- Pacientes que al momento del estudio presentaron parámetros hematológicos anormales (cuenta plaquetaria <150,000/ml o >450,000ml, hemoglobina <8gr/dL).

Exclusión:

- Plasmas lipémicos
- Discontinuación del uso de aspirina en cualquier momento del estudio.
- Uso de antiinflamatorios no esteroideos (COX-1 y COX-2) durante la realización del estudio.

D) Procedimiento a seguir:

Se realizó estudio de recuento de plaquetas automático, estudio de agregometría óptica en Plasma Rico en Plaquetas (PRP) pre-administración de aspirina. Posteriormente cada voluntario ingirió 160 mg de aspirina al día (por la noche) durante 3 días. Al cuarto día se realizó nuevamente toma de muestra y se repitió estudio de recuento plaquetario, agregometría óptica en PRP. Se tomó 1 muestra de sangre venosa en

ayuno (1 tubo con anticoagulante EDTA y 4 tubos con anticoagulante con citrato de sodio al 3.2% (0.105M) pre y post-administración de aspirina a los 3 días. Para establecer la variabilidad intraensayo de la Agregometría Óptica se tomó muestra de sangre venosa en ayuno y se practicó la prueba en 11 ocasiones en un solo voluntario.

Agregometría óptica:

- Para las pruebas de agregometría óptica se utilizaron 4 tubos con citrato de sodio al 3.2% (0.105M) con un volumen mínimo de 4.5ml de sangre venosa.
- Después de tomadas las muestras, éstas se procesaron en un periodo no mayor a 3 horas, durante ese tiempo permanecieron a temperatura ambiente.
- Para la obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) las muestras en citrato de sodio se centrifugaron a 300 g por 10 minutos, posteriormente se separó el plasma en tubos de plástico y se ajustó el PRP=250-300 mil plaquetas/mm³.
- La muestra en citrato de sodio remanente se recentrifugó a 2000 g por 15 minutos para obtención de Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)= <10 mil plaquetas/mm³.
- Se usó un agregómetro óptico Crono-log, el cual se encendió 10 minutos antes de realizar la prueba para alcanzar la temperatura de 37°C, se colocaban en los pozos de incubación del agregómetro las cubetas de vidrio con un agitador magnético en su interior.

- Se adicionaron 500 μ l de PRP y PPP en sus cubetas correspondientes.
- Se evaluó la agregación de PRP frente a cuatro agonistas: Adenosín difosfato (ADP), ácido araquidónico (AA), colágeno (COL) y epinefrina (EPI)).
- Se utilizaron:
 - ADP en dosis de 5 μ L para 500 μ L de muestra para una concentración de 10 μ M
 - Ácido araquidónico en dosis de 5 μ L para 500 μ L de muestra para una concentración de 0.5mM
 - Colágeno en dosis de 1 μ L para 500 μ L de muestra para una concentración final de 2 μ g/mL.
 - Epinefrina en dosis de 5 μ L para 500 μ L de muestra para una concentración de 10 μ M.
- Los cambios en la transmisión de la luz fueron grabados en un tiempo total de 7 minutos.

Recuento plaquetario:

- Se realizó en el Contador celular marca Beckman Coulter.
- Los valores de referencia para cuenta plaquetaria fueron de 150,000-450,000/ml.

E) Variables:

- **Variables independientes:** concentración de ADP, AA, colágeno, epinefrina.
- **Variables dependientes:** porcentaje de agregación plaquetaria con ADP, AA, colágeno, epinefrina.

F) Análisis estadístico:

Para el registro de la información se utilizaron hojas de Excel. Mediante el software SPSS para Windows versión 11 se obtuvo valores de referencia que se calcularon en base a la media \pm 2 desviaciones estándar para abarcar el 95% de la población.

Para evaluar diferencias entre las muestras basales y post-administración de aspirina se utilizó T de Student para poblaciones con distribución normal y Prueba de Wilcoxon para aquellas que no tenían distribución normal.

VIII. ASPECTOS ÉTICOS

Todos los participantes en este estudio fueron voluntarios, adultos sanos que dieron su consentimiento bajo información, en éste se incluyeron los riesgos del estudio (ver anexo).

IX. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 40 voluntarios sanos, 20 mujeres (50%) y 20 hombres (50%), con un promedio de edad de 35.72 años. Los resultados obtenidos previa administración de aspirina para el recuento de Hb fue de 15.18 gr/dL como promedio y DS \pm 1.59, Hct promedio de 45.40% \pm 4.08, Eritrocitos promedio de 5.07 millones/mm³ \pm 0.41 y Plaquetas promedio de 264.75 x 10³/mm³ \pm 41.06, con respecto a la prueba de agregación plaquetaria los resultados fueron los siguientes: ADP promedio 73.53% \pm 17.34, ácido araquidónico promedio 85.83% \pm 11.42, colágeno promedio 85% \pm 12.4, epinefrina 85% \pm 10.57. (Tabla 1)

Al comparar la respuesta con los diferentes agonistas entre género, el valor de p para el ADP fue de 0.907 y el de la epinefrina 0.076, lo que se traduce en la obtención de valores de referencia tanto en hombres como en mujeres con dichos agonistas. (Tabla 2) Por lo tanto, los valores de referencia para la agregación plaquetaria pre-administración de aspirina obtenidos en este estudio fueron: para ADP 38.85-108.21%, para ácido araquidónico en hombres 66.97-95.13% y en mujeres 64.52-116.68%, para colágeno 60.2-109.80% y para epinefrina en hombres 69.88-94.12% y en mujeres 61.64-114.36%. (Tabla 3)

El coeficiente de variación intraensayo fue de 9.16% para el ADP, 2.57% para el ácido araquidónico y 6.92% para el colágeno y la epinefrina. (Tabla 4).

Posterior a la ingesta de 160 mg de aspirina al día por 3 días, el promedio de Hb en los voluntarios fue de 15.26gr/dL con una DS de \pm 1.60, Hct 45.78% \pm 4.28, Eritrocitos 5.11 \pm .042 y Plaquetas 266.77 \pm 42.66. La agregación plaquetaria post mostró los siguientes resultados: con ADP promedio 39% \pm

16.51, ácido araquidónico promedio $2\% \pm 2$, colágeno promedio $9\% \pm 11$, epinefrina promedio $13\% \pm 10$. (Tabla 1)

Al correlacionar los estudios pre y post-administración de aspirina se encontró un valor de p de $<.001$ para los 4 agonistas utilizados. (Tabla 1)

X. DISCUSIÓN

La falta de valores de referencia universales y de estandarización de la agregometría óptica obliga a cada laboratorio a realizar estudios en su población y observar el comportamiento de la resistencia a los antiagregantes plaquetarios.^{12,13} Los resultados obtenidos de la agregación de pacientes sanos muestran que la agregación plaquetaria es una prueba reproducible con un coeficiente de variación <10% por lo tanto se pudieron obtener los rangos de referencia para cada uno de los agonistas.

Los resultados obtenidos después de la dosis de 160 mg de aspirina al día por 3 días mostraron afectación negativa en la agregación con todos los agonistas estudiados, siendo el ácido araquidónico el más sensible y reproducible, por lo tanto es el recomendable para detectar sujetos con resistencia a este medicamento;⁸⁸⁻⁹⁰ lo cual coincide con resultados previos, el criterio de resistencia de <20% reportado en la literatura se valida en el presente estudio.^{59,62}

Durante este estudio ninguno de los voluntarios presentó resistencia funcional a la aspirina, lo que fue adecuado al tamaño de la muestra.

Los valores de referencia para la agregación plaquetaria pre-administración de aspirina (basal) obtenidos en nuestra población son menores a los reportados por la literatura (en donde se considera una agregación plaquetaria normal cuando un individuo presenta valores por arriba 70% de agregación plaquetaria ya sea con ADP, ácido araquidónico, colágeno o epinefrina que nieguen ingestión de cualquier medicamento), de especial importancia los valores obtenidos para el ácido áraquidónico (que ha demostrado ser el agonista más

específico en la evaluación de la respuesta a la medicación con aspirina) los cuales demuestran que una agregación de hasta el 63% es considerada normal para nuestra población.

XI. CONCLUSIONES

El presente trabajo nos permitió validar los valores de referencia de la agregación plaquetaria en población normal, y nos ayuda a establecer parámetros de anormalidad para el diagnóstico de la resistencia a la aspirina; al mismo tiempo que se estandarizó la prueba mediante la cual se logrará dicho propósito, la cual consistirá en la realización de agregometría óptica con ácido araquidónico y ADP en plasma rico en plaquetas donde el criterio para su interpretación será el siguiente:

% de agregación plaquetaria obtenido en pacientes bajo tx con aspirina	Interpretación
> 20% ácido araquidónico > 40% ADP	Resistencia a la aspirina
> 20% ácido araquidónico < 40% ADP	Resistencia a la aspirina y la probable presencia de trombocitopatía ó ingestión de otro antiagregante plaquetario
< 20% Ácido araquidónico > 40% ADP	Adecuada antiagregación con aspirina
< 20% Ácido araquidónico < 40% ADP	Adecuada antiagregación con aspirina y la probable presencia de trombocitopatía ó ingestión de otro antiagregante plaquetario

Es importante en los pacientes que reciban aspirina y que no se les realizó prueba basal, utilizar siempre ADP para detectar probables trombocitopatías para su correcta interpretación.

La variabilidad intraensayo de la agregometría óptica realizada en nuestro laboratorio de patología clínica es aceptable al mostrar resultados menores al 10% en todos los agonistas.

XII. RECOMENDACIONES

- Realizar la prueba de resistencia a la aspirina a los pacientes con tratamiento preventivo ó con terapia aguda en quienes se desee comprobar adecuada antiagregación con dicho medicamento.
- Se recomienda la realización de la prueba mínimo 7 días después de haber iniciado el tratamiento con aspirina, lo anterior debido a los defectos de absorción de la droga que pudieran existir en algunas personas.
- Con respecto a la metodología de la prueba es necesario:
 - o Que el personal que la realice esté calificado
 - o Procesar la muestra en un periodo no mayor a 3 horas
 - o Realizar el procedimiento de acuerdo a la instrucción del fabricante y a las buenas prácticas del laboratorio
 - o Validar los rangos de referencia.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br Med J* 1994;308:81-106
2. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-II: maintenance of vascular graft or arterial patency by antiplatelet therapy. *Br Med J* 1994;308:159-168
3. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-III: reduction in venous thrombosis and pulmonary embolism by antiplatelet prophylaxis among surgical and medical patients. *Br Med J* 1994;308:235-246
4. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J* 2002;324:71-86
5. Schror K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin thromb Hemost* 1997;23: 349-356
6. Patrono C. Aspirin as an Antiplatelet Drug. *N Engl J Med* 1994;330(18): 1287-1294
7. Awtry E, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000;101:1206-1218
8. Roth G, Calverley D. Aspirin, platelets and thrombosis: theory and practice. *Blood* 1994;83:885-898
9. Patrono C, Collier B, Fitzgerald G: Platelet-Active Drugs. The Relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 2004;126:234-264
10. Majerus P, Tollefsen D. En Anticoagulantes, Trombolíticos y Antiplaquetarios. En Hardman J, Limbird L. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Goodman & Gilman. Editorial Mc Graw-Hill. 2003:1535-1554.
11. Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost* 2003;1:1710-1713
12. McKee S, Sane D, Deliargyris E. Aspirin resistance in cardiovascular disease: A review of Prevalence, Mechanisms and Clinical significance. *Thromb Haemost* 2002;88:711-715
13. De Gaetano G, Cerletti C. Aspirin resistance: a revival of platelet aggregation tests? *J Thromb Haemost* 2003;1:2048-2050

14. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet* 2006;367:606-617
15. Grotemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. Two years follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res* 1993;71:397-403
16. Eikelboom J, Hirsh J, Weitz J, 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
17. Gum P, Kottke-Marchant K, Welsh P, White J, Topol E. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;41:961-965
18. Mueller M, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D et al. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost* 1997;78:1003-1007.
19. Chen W, Lee P, Ng W, Tse H, Lau C. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pre-treatment. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;43:1122-1126
20. Kauhansky K. Trombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995;86:419-431
21. George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-1539
22. Collier BS: Biochemical and electrostatic considerations in primary platelet aggregation. *Ann NY Acad Sci* 1984;416:693
23. Cramer E: Anatomy and structural organization of the platelet, en Hemostasis and Trombosis: Basic Principles and Clinical Practice, editado por RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, AW Clowes, JN George, 4ta. Edición, pag 411-459. JB Lippincott, Philadelphia, 2001.
24. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction; granules constituents, secretion and function. *Platelets* 2001;12:261-273
25. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1127-1234
26. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, De Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Throm Haemost* 2004;2:561-573

27. Ilveskero S, Siljander P, Lassila R. Procoagulant activity of platelets adhered to collagen or plasma clot. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21: 628-635
28. Michelson AD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb Thrombolysis* 2003;16:7-12
29. Bennett JS, Vilaire G. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 1979;64:1393-1401
30. Jack D. One hundred years of aspirin. *The Lancet* 1997;350:437-439
31. 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
32. McNicol A, Israels SJ. Platelets and anti-platelet therapy. *J Pharmacol Sci.* 2003;93:381-396
33. Clarke RJ, Mayo G, Price P, Fitzgerald GA. Suppression of thromboxane A2 but not systemic prostacycline by controlled-release aspirin. *N Eng J Med.* 1991;325:1:137-141.
34. Björnsson TD, Schneider DE, Rees G et al. Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis: fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;250:154-161
35. Quick AJ, Cleasceri L. Influence of acetylsalicylic acid and salicylamide on the coagulation of blood. *J Pharmacol Exp Ther.* 1960;128:95-99
36. López- Farré 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
37. O'Brien JR. Effects of salicylates on human platelets. *Lancet* 1968;1:779-783
38. Jiménez AH, Stubbs ME, Tofler GH, Winther K, Williams GH, Muller JE. Rapidity and duration of platelet suppression by enteric-coated aspirin in healthy young men. *Am J Cardiol* 1992;69:258-262
39. Latini R, Cerletti C, de Gaetano G, Dejana E, Galletti F, Urso R, Marzot M. Comparative bioavailability of aspirin from buffered, enteric-coated and plain preparations. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1986;24:313-318
40. Burch JW, Stanford N, Majerus PW. Inhibition of platelet prostaglandin synthase by oral aspirin. *J Clin Inves* 1979;61:314-319

41. Bradlow BA, Chetty N. Dosage frequency for suppression of platelet function by low dose aspirin. *Thromb Res* 1982;27:99-110
42. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 1982;69:1366-1372
43. Weksler BB, Pett SB, Alonso D, Richter RC, Stelzer P et al. Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med* 1983;308:800-805
44. Cerletti C, Carriero MR, de Gaetano G. Platelet-aggregation response to single or paired aggregating stimuli alter low-dose aspirin. *N Engl J Med* 1986;314:316-318
45. Tohgi H, cono S, Tamura K, Kimura B, Katsumi K. Effects of low-to high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A2 and prostacyclin. *Stroke* 1992;23:1400-1403
46. Eidelman RS, Herbert PR, Weisman SM, Hennekens CH. An update on aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 2003;163:2006-2010
47. Sanmuganathan PS, Ghahramani P, Jackson PR, Wallis EJ, Ramsay LE. Aspirin for primary prevention of coronary heart disease: safety and absolute benefit related to coronary risk derived from meta-analysis of randomized trials. *Heart* 2001;85:265-271
48. Hayden M, Pignone M, Phillips C, Murlow C. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002;136:161-172
49. de Feyter PJ, van den Brand M, Laarman GJ, van Domburg R, Serruys PW, Suryapranata H. Acute coronary artery occlusion during and alter percutaneous transluminal coronary angioplasty: frequency, prediction, clinical course management and follow-up. *Circulation* 1991;83:927-936
50. Baim DS, Carrozza JP, Stent thrombosis: closing in on the best preventive treatment. *Circulation* 1997;95:1098-1100
51. Schwartz L, Bourassa MG, Lesperance J, Aldridge HE, Kazim F, Salvatori VA, Henderson M, Bonan R, David PR. Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1988;318:1714-1719

52. Gavaghan TP, GebSKI V, Baron DW. Immediate postoperative aspirin improves vein graft patency early and late after coronary artery bypass graft surgery: a placebo-controlled, randomized study. *Circulation* 1991;83:1526-1533
53. Goldman S, Copeland J, Morwitz T, Henderson W, Zadina K, Ovit T, Doherty J, Read R, Chester E, Sako Y, Lancaster L, Emery R, Sharma GVRK, Josa M, Pacold I, Montoya A, Parikh D, Sethi G, Holt J, Kirklin J, Shabetai R, Moores W, Aldridge J, Masud Z, DeMots H, Floten S, Haakenson C, Harker LA. Improvement in early saphenous vein graft patency after coronary artery bypass surgery with antiplatelet therapy: results of Veterans Administration Cooperative Study. *Circulation* 1988;77:1324-1332
54. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988;2:349-360
55. Baigent C, Collins R, Appleby P, Parish S, Sleight P, Peto R. ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomized comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. *Br Med J*. 1998;316:1337-1343
56. Lana A, Fernández A. ¿Deben administrarse protectores gástricos a los pacientes coronarios que toman dosis bajas de aspirina de forma crónica. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:1361-1364
57. Sandler DP, Burr FR, Weinberg CR. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk for chronic renal disease. *Ann Intern Med* 1991;115:165-172
58. Buchanan MR, Schwartz L, Bourassa M, et al. Results of the BRAT study-a pilot study investigating the possible significance of ASA nonresponsiveness on the benefits and risks of ASA on thrombosis in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Can J Cardiol* 2000;16:1385-1390
59. Gum P, Kottke-Marchant K, Poggio E, Gurm H, Welsh P, Brooks L, Sapp S, Topol E. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardio* 2001;88:230-235
60. Bhatt D. Aspirin resistance: More than just a Laboratory Curiosity. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;43:1127-1129
61. Wong S, Appleberg M, Ward CM, Lewis DR. Aspirin resistance in cardiovascular disease: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27:456-465
62. Dussailant G, Zapata M, Fardella P, Conte G, Cuneo M. Frecuencia y características de la resistencia a aspirina en pacientes cardiovasculares chilenos. *Rev Méd Chile* 2005;133:409-417

63. Rao GH, Johnson GG, Reddy KR, White JG. Ibuprofen protects platelet cyclooxygenase from irreversible inhibition by aspirin. *Arteriosclerosis* 1983;3:383-388
64. Cerletti C, Dell'Elba G, Manarini S, Pecce R, Di Castelnuovo A, Scorpiglione N, Feliziani V, de Gaetano G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic differences of two low doses of aspirin possibly affecting therapeutic outcomes. *Clin Pharmacokin* 2003;12:1059-1070
65. Konieczkowski M, Skrinska VA. Increased synthesis of thromboxane A(2) and expression of procoagulant activity by monocytes in response to arachidonic acid in diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001;65:133-138
66. Hung J, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995;92:2432-2436
67. Weber AA, Liesener S, Schanz A, Hohlfeld T, Schror K. Habitual smoking causes an abnormality in platelet thromboxane A2 metabolism and results in an altered susceptibility to aspirin affects. *Platelets* 2000;11:177-182
68. Pawlowski NA, Kaplan G, Hamill AL, Cohn ZA, Scott WA. Arachidonic acid metabolism by human monocytes. Studies with platelet-depleted cultures. *J Exp Med* 1983;158:393-412
69. Valles J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Cosin J, Sanchez E, Broekman MJ, Marcus AJ. 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
70. Kunicki TJ. The influence of platelet collagen receptor polymorphisms in hemostasis and thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:14-20
71. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:122-130
72. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1631-1636
73. Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ. Aspirin resistance and genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis* 2002;14:51-58

74. Cooke GE, Bray PF, Hamlington JD, Pham DM, Goldschmidt-Clermont PJ. PIA2 polymorphism and efficacy of aspirin. *Lancet* 1998;351:1253 (Letter)
75. Eikelboom J, Hankey G. Aspirin resistance: A new independent predictor of vascular events? *Journal of the American College of Cardiology* 2004;41: 966-968
76. Helgason C, Bolín K, Holf J, Winkler S, Mangat A. Development of Aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994;25: 2331-2336
77. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber A. Functional and Biochemical Evaluation of Platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003;108:542-547
78. Zaverio M. Platelets in atherothrombosis. *Nature Medicine* 2002;8:1227-1234
79. Michelson A. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation* 2004;110:489-493
80. Gomal P, Hollensead S. Laboratory testing for platelet function at University Hospital. *Laboratory Advisor University of Louisville School of Medicine* 2006;19:1-4
81. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews* 2005;19:111-123
82. Michelson A, Cattaneo M, Eikelboom J, Gurbel S. Aspirin resistance: position paper of the working group on aspirin resistance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;3:1309-1311
83. Catella F, Healy D, Lawson JA, Fitzgerald GA. 11-Dehydrothromboxane B₂: A quantitative index of thromboxane A₂ formation in the human circulation. *Proc. Natl Acad Sci USA*.1986;83:5861-5865
84. Reinke M. Monitoring thromboxane in body fluids: a specific ELISA for 11-dehydrothromboxane B₂ using a monoclonal antibody. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1992;262:658
85. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expresión of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999;155:1281-1291
86. Riutta A, Mucha I, Vapaatalo H. Solid-phase extraction of urinary 11-dehydrothromboxane B₂ for reliable determination with radioimmunoassay. *Anal Biochem* 1992;202:299-305

87. Mackie IJ, Jones R, Machin SJ. Platelet impedance aggregation in whole blood and its inhibition by antiplatelet drugs. *J Clin Pathol* 1984;37:874-878
88. Yardumian D, Mackie IJ, Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *J Clin Pathol* 1986;39:701-712
89. Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: Description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol* 2005;123:172-183
90. Burke J, Kraft W, Greenberg et al. Relationship of Arachidonic Acid Concentration to Cyclooxygenase-Dependent Human Platelet Aggregation. *J Clin Pharmacol* 2003;43:983-989
91. Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1962;162:67-71
92. Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC. Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:113
93. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio T, et al. Characterization of an in Vitro platelet function analyser, PFA-100. *Clin Appl Thromb Hemost* 1996;2:241
94. Homonick M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. Monitoring of Aspirin (ASA) Pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost* 2000;83:316-321
95. Chakroun T, Gerotziapas G, Robert F et al. In Vitro aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *Br J Haemat* 2004;124:80-85
96. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *The Lancet* 1996; 348: 1329-1339
97. Cattaneo M. Aspirin and Clopidogrel: Efficacy, Safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1980-1987
98. Brecher G, Schneiderman M, Cronkite EP. The reproducibility and constancy of the platelet count. *Am J Clin Pathol* 1953;23:15-26
99. Harrison P, Briggs C, Machin SJ. Platelet counting. *Methods Mol Biol* 2004;272:29-46
100. Mundschenk D, Connelly D, White JG. An improved technique for the electronic measurement of platelet size and shape. *J Lab Clin Med.* 1976; 88:301-315

101. The British Society for Haematology (BCSH) Haemostasis and Trombosis Task Force. Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol* 1988; 41:1322-1330

102. Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 1990;16:1-20

103. O'Brien JM. Platelet aggregation. II. Some results from a new method of study. *J Clin Pathol* 1962;15:452-481

XIV. ANEXOS

A. Historia Clínica

HISTORIA CLÍNICA

- Nombre
- Edad
- Sexo
 - En caso de mujeres, embarazo?

- AHF:
 - Enfermedades hereditarias de la función plaquetaria
 - Trombastenia de Glanzman
 - Síndrome Bernard –Soulier
 - Síndrome plaqueta gris
 - Enfermedad de von Willebrand

- APP:
 - Gastritis
 - Diabetes Mellitus
 - Dislipidemia
 - Tabaquismo activo
 - Infarto al miocardio
 - Angina estable
 - Angina inestable
 - Insuficiencia cardiaca
 - EVC
 - Síndromes mieloproliferativos: Policitemia vera, trombocitemia esencial
 - paraproteinemias malignas: Mieloma múltiple
 - Uso de medicamentos (AINES)
 - Alergia a la aspirina

B. Carta de consentimiento bajo información

AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER I. A. P.

ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA RESISTENCIA A LA ASPIRINA EN EL LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA DEL CMABC

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del voluntario:

Nombre del médico que informa:

Fecha:

- 1) **INFORMACIÓN SOBRE EL PROTOCOLO:** El presente protocolo pretende evaluar la respuesta *in vitro* a la medicación antiagregante con aspirina en personas sanas mediante el estudio de laboratorio de agregometría óptica, dicho protocolo se efectuará durante los meses de mayo, junio y julio del 2007 en el Laboratorio del Hospital ABC campus Observatorio. El médico responsable realizará historia clínica previa a los candidatos a participar.
- 2) **PROCEDIMIENTO:** El procedimiento consiste en tomar una muestra de sangre periférica y realizar estudio de recuento de plaquetas automático y estudio de agregación óptica en PRP pre-administración de aspirina a todos los voluntarios del protocolo. Posteriormente cada voluntario tomará 160 mg de aspirina al día (por la noche) durante 3 días. Al cuarto día se realizará nuevamente toma de muestra y se repetirán estudio de recuento plaquetario, agregación óptica en PRP y prueba de tiempo de obturación. Se tomará 1 muestra de sangre venosa en ayuno (1 tubo lila EDTA y 5 tubos celestes con citrato de sodio al 3.8% (0.129M) pre y post-administración de aspirina.
- 3) **RIESGOS POSIBLES Y MOLESTIAS:** Los efectos adversos más comunes de la aspirina son los gastrointestinales (dolor epigástrico, dispepsia, gastritis erosiva o ulceración, nauseas, vómitos y estreñimiento) y suelen ser dosis dependientes (>325mg/día). La hemorragia gastrointestinal asociada al uso de dosis bajas de aspirina (100-300mg/día) se ha observado en un 2% en pacientes con uso crónico (+de 6 meses) de dicho medicamento. La hipersensibilidad a la aspirina se caracteriza por urticaria, angioedema o asma. Con respecto a la toma de muestras se puede presentar dolor leve y/o hematoma en la zona de punción.
- 4) **CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN:** Cualquier información obtenida de este procedimiento, en el cual yo sea identificado, será

disponible sólo con mi autorización. Si la información obtenida de este procedimiento es publicada, no seré identificado por nombre.

- 5) **PARA RESPONDER A PREGUNTAS Y NOTIFICACIÓN DE LA INFORMACIÓN:** Debo consultar a la Dra. Roxana Carolina Tamayo Gutiérrez residente de Tercer año de la especialidad de Patología Clínica y responsable de este proyecto de investigación, al mismo tiempo manifiesto que he recibido información suficiente, clara y extensa sobre el protocolo de investigación al cual ingresaré, así como las respuestas a todas las preguntas antes de participar en él.
- 6) **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA CON DERECHO A RETIRARSE DEL PROCEDIMIENTO:** Se me informó, que mi participación en este procedimiento es voluntaria y soy libre de rehusar a mi consentimiento para participar en él.
- 7) **INFORMACIÓN RELACIONADA CON RIESGOS PARA CONTINUAR MI PARTICIPACIÓN:** El médico responsable de este protocolo de investigación me explicó que en caso de tener evidencia de algún riesgo, seré informado y puedo modificar continuar participando en este procedimiento.
- 8) **FIRMA DEL CONSENTIMIENTO:** Los médicos han contestado a mis preguntas, se han explicado los términos técnicos del texto a mi entera satisfacción y estoy de acuerdo en participar en el protocolo **ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA RESISTENCIA A LA ASPIRINA EN EL LABORATORIO DE PATOLOGIA CLINICA DEL CMABC**

Nombre:

Fecha:

Firma:

Testigo:

Fecha:

Firma:

Médico Responsable:

Fecha:

Firma:

C. Tablas de resultados

	Pre-administración aspirina Promedio \pm 1 DS	Post- administración aspirina Promedio \pm 1 DS	p
Hemoglobina	15.18 \pm 1.59	15.26 \pm 1.60	.361
Hematocrito	45.40 \pm 4.08	45.78 \pm 4.28	.086
Eritrocitos	5.07 \pm 0.41	5.11 \pm .042	.073
Plaquetas	264.75 \pm 41.06	266.77 \pm 42.66	.450
ADP	73.53 \pm 17.34	38.73 \pm 16.51	<.001
Ac. Araquidónico	85.83 \pm 11.42	2.45 \pm 2.49	<.001
Colágeno	85 \pm 12.4	9.43 \pm 11.05	<.001
Epinefrina	85 \pm 10.57	12.7 \pm 10.76	<.001

Tabla 1. Valores pre y post-administración de aspirina.

Agonista	Hombres	Mujeres	p
ADP	73.20 \pm 14.45	73.85 \pm 20.20	0.907
Ac. Araquidónico	81.05 \pm 7.04	90.60 \pm 13.04	0.007
Colágeno	82.65 \pm 10.99	87.35 \pm 13.53	0.235
Epinefrina	82 \pm 6.06	88 \pm 13.18	0.076

Tabla 2. Valores pre-administración de aspirina de acuerdo a género.

Agonista	Valor de Referencia Pre-administración de Aspirina	
ADP	38.85 – 108.21%	
Ácido Araquidónico	Hombres 66.97 – 95.13%	Mujeres 64.52 -116.68%
Colágeno	60.2 – 109.80%	
Epinefrina	Hombres 69.88-94.12	Mujeres 61.64-114.36

Tabla 3. Valores de referencia pre-administración de Aspirina para agregación plaquetaria.

Agonista	Coefficiente de Variación
ADP	9.16%
Ácido Araquidónico	2.57%
Colágeno	6.92%
Epinefrina	6.92%

Tabla 4. Variabilidad intraensayo de la agregación plaquetaria.

A. Imágenes



Imagen 1. Agregómetro óptico Crono-log



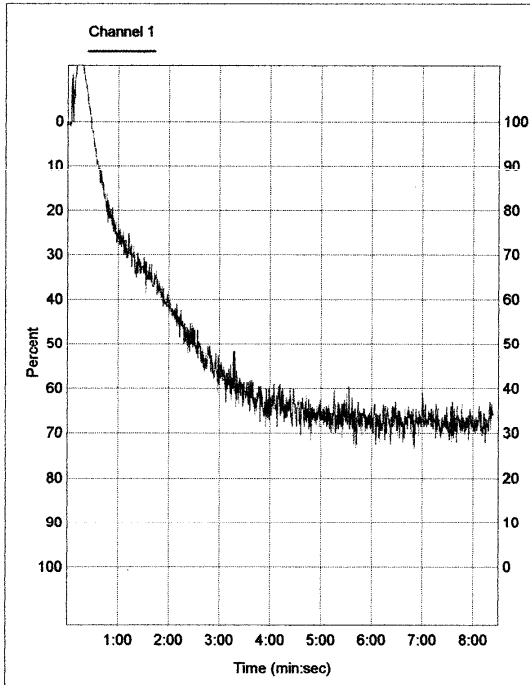
Imagen 2. Agregometría óptica

Name
ID PRE Date 08/01/2007
Hosp. ABC OBS

Channel 1

Instrument Opt
Reagent ADP
Stirrer 1000
Gain 20/5
Amplitude 72%
Slope 82

Comments



Name
ID POST Date 06/05/2007
Hosp. ABC OBS

Channel 1

Instrument Opt
Reagent ADP
Stirrer 1000
Gain 20/5
Amplitude 51%
Slope 84

Comments

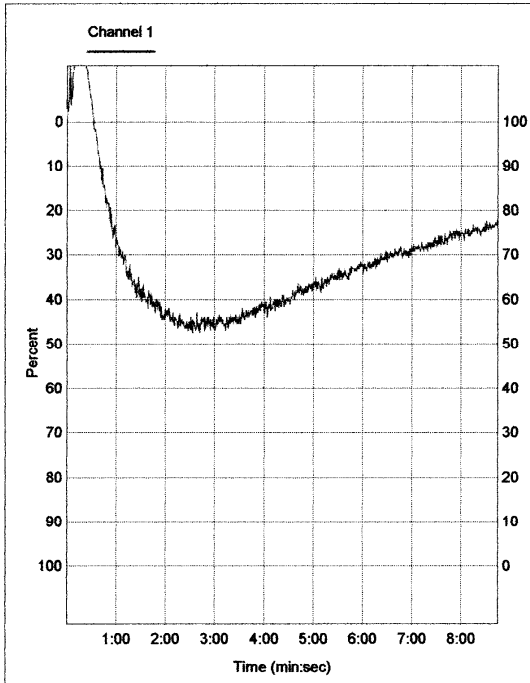


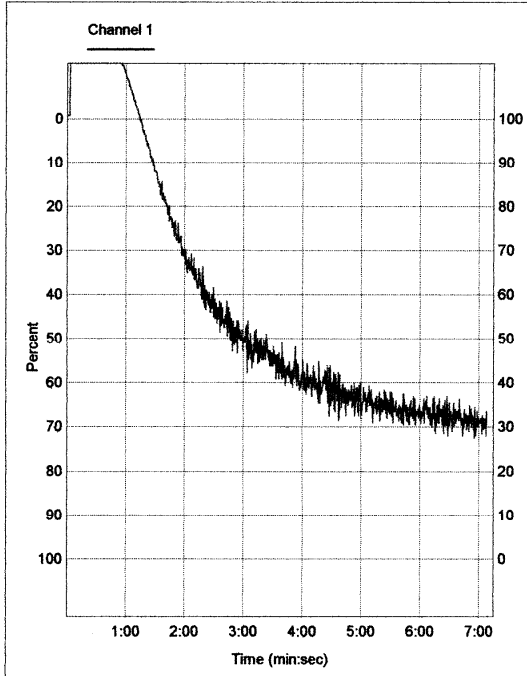
Imagen 3. Gráficas de agregación plaquetaria con ADP pre y pos-administración de Aspirina.

Name
ID PRE Date 05/28/2007
Hosp. ABC OBS

Channel 1

Instrument Opt
Reagent AC.ARA
0.5 mM
Stirrer 1000
Gain 20/5
Amplitude 73%
Slope 51

Comments



Name
ID POST Date 06/14/2007
Hosp. ABC OBS

Channel 1

Instrument Opt
Reagent AC.ARA
0.5 mM
Stirrer 1000
Gain 20/5
Amplitude 2%
Slope 47

Comments

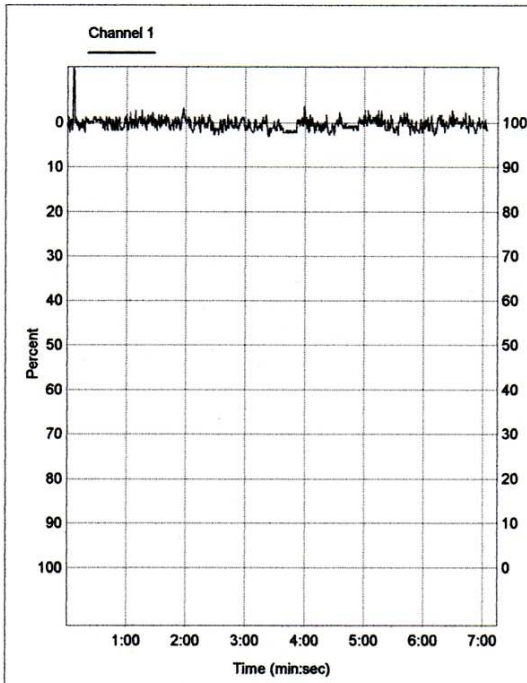
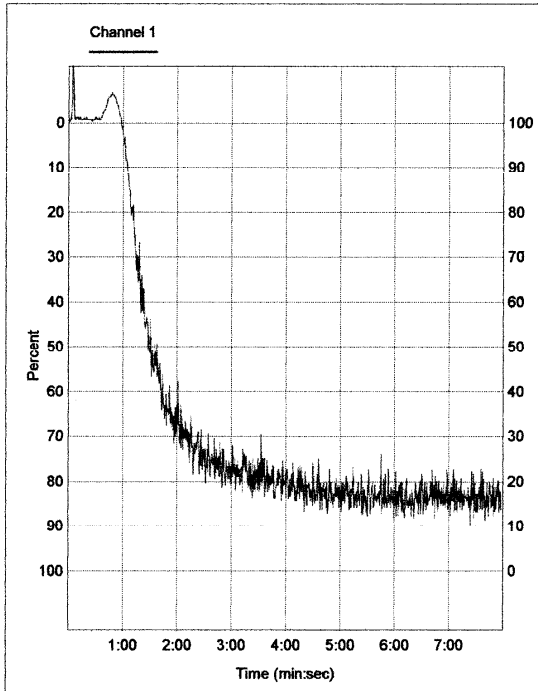


Imagen 4. Gráficas de agregación plaquetaria con ácido araquidónico pre y pos-administración de Aspirina.

Name
ID **PRE** Date 08/01/2007
Hosp. ABC OBS

Channel 1
Instrument Opt
Reagent COL
Stirrer 1000
Gain 20/5
Amplitude 88%
Slope 128

Comments



Name
ID **POST** Date 05/24/2007
Hosp. ABC OBS

Channel 1
Instrument Opt
Reagent COL
Stirrer 1000
Gain 20/5
Amplitude 12%
Slope 44

Comments

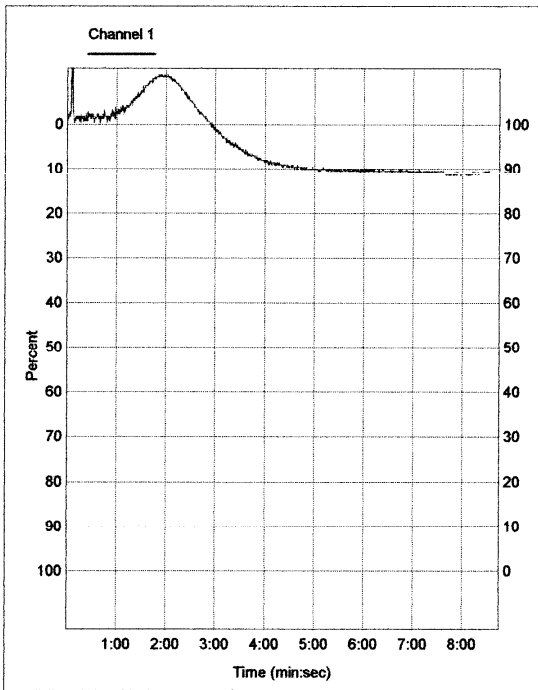
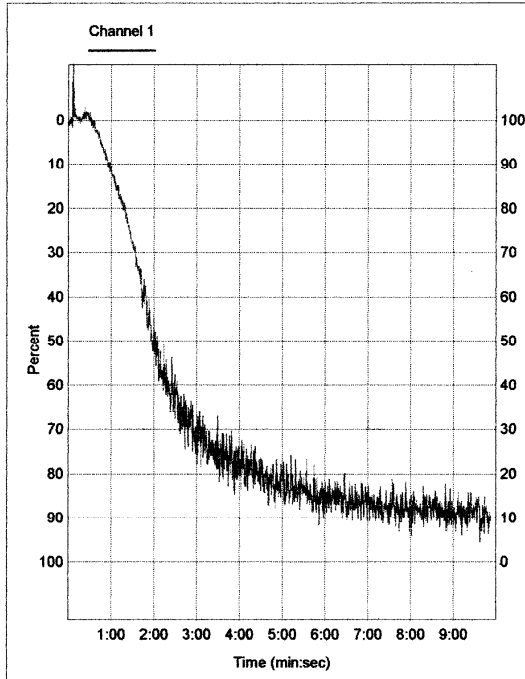


Imagen 5. Gráficas de agregación plaquetaria con colágeno pre y post-administración de Aspirina.

Name
ID -PRE Date 05/29/2007
Hosp. ABC OBS

Channel 1
Instrument Opt
Reagent Epinefrina
Stirrer 1000
Gain 20/5
Amplitude 91%
Slope 69

Comments



Name
ID -POST Date 06/14/2007
Hosp. ABC OBS

Channel 1
Instrument Opt
Reagent Epinefrina
Stirrer 1000
Gain 20/5
Amplitude 12%
Slope 31

Comments

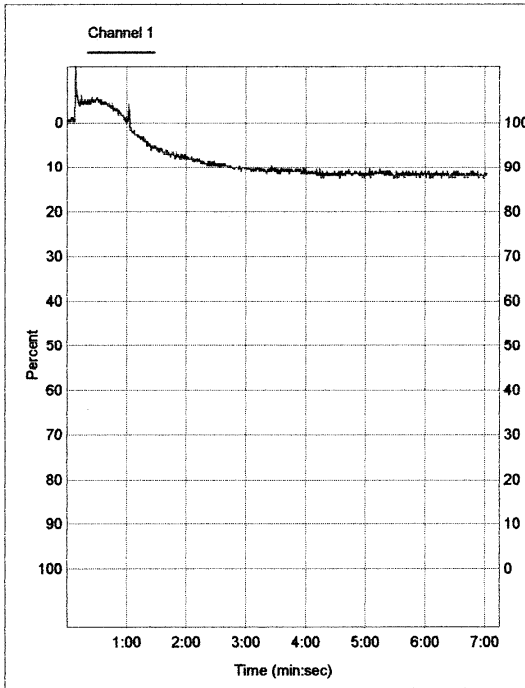


Imagen 6. Gráficas de agregación plaquetaria con epinefrina pre y pos-administración de Aspirina.



Imagen 7. Platelet function analyzer-100 (PFA-100)