



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO POR
DOS MÉTODOS: AGREGOMETRÍA PLAQUETARIA Y TIEMPO DE OCLUSIÓN
EN EL PFA-100.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ISMAEL ACOSTA MEZA

MÉXICO, D.F. AÑO 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** ROSALINDA VELAZQUEZ SALGADO

VOCAL: **Profesor:** ARACELI MENDIETA RERGIS

SECRETARIO: **Profesor:** EVELYN CORTINA DE LA ROSA

1er. SUPLENTE: **Profesor:** NATIVIDAD GARCÍA ESCAMILLA

2° SUPLENTE: **Profesor:** JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE TROMBOSIS,
FIBRINÓLISIS Y FUNCIÓN PLAQUETARIA, DEPARTAMENTO DE
HEMATOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ.

ASESOR DEL TEMA: EVELYN CORTINA DE LA ROSA

SUSTENTANTE: ISMAEL ACOSTA MEZA

I.-INTRODUCCIÓN.....	1
1.-Fisiología de las plaquetas.....	1
2.- Estructura de las plaquetas.....	2
2.1.-Superficie plaquetaria.....	2
Membrana plasmática.....	2
Glicocalix.....	4
2.2.-Sistemas membranosos plaquetarios.....	4
Sistema Canalicular Conectado a la Superficie (SCCS).....	4
Túbulos Densos.....	5
2.3.-Citoesqueleto plaquetario.....	5
Región submembranosa.....	6
Actina citoplásmica y filamentos intermedios.....	6
Microtúbulos.....	7
2.4.-Gránulos plaquetarios y organelos.....	7
Gránulos α	8
Gránulos densos.....	10
Lisosomas.....	10
Organelos: microperoxisomas, vesículas recubiertas, mitocondrias y glucógeno.....	11
3.-Función de las plaquetas.....	12
4.-Fases de la activación de las plaquetas.....	13
4.1.-Adhesión plaquetaria.....	14
4.2.-Activación.....	15
4.3.-Secreción y Agregación.....	19
5.-Retracción del coágulo.....	22
6.-Mecanismos regulatorios de la activación y agregación plaquetaria.....	24
6.1.-Prostaglandinas inhibitorias.....	25
6.2.-Óxido Nítrico.....	25
6.3.-Internalización de GpIIb/IIIa.....	26

6.4.-Ectoprotein cinasa	27
7.-Patologías	27
7.1.Trastornos adquiridos de la función plaquetaria	28
7.2.-Trastornos hereditarios de la función plaquetaria	32
Defectos en los receptores plaquetarios.....	32
Defectos de Contenido granular/deficiencias de almacenamiento.....	33
Defectos de liberación.....	34
Defectos de factor de coagulación que afectan la función plaquetaria.	34
8.-Síndromes coronarios agudos (SICA)	36
9.-Participación de las plaquetas en los SICA	39
9.1.-Trombosis e inflamación	39
10.-Tratamientos antiagregantes.....	41
10.1.-Tienopiridinas.	41
Ticlopidina	41
Clopidogrel.....	42
Prasugrel.....	42
10.2.-Inhibidores de ciclooxigenasa	43
Aspirina	43
Triflusal	45
10.3.-Otros.....	45
Inhibidores de la Glicoproteína IIb/IIIa	45
Fosfodiesterasas inhibitorias.	46
11.-Metodologías para evaluar la función plaquetaria	47
11.1.-Agregometría.....	47
Agregometría en plasma rico en plaquetas (PRP). Método óptico.....	47
Agregometría en sangre entera. Método de impedancia.	50
11.2-Point of care: Pruebas que se realizan al pie de la cama del paciente.....	51
VerifyNow.....	51
Plateletworks.....	53

Tromboelastograma. Sistema de mapeo plaquetario.	53
Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP)	54
PFA-100 Antecedentes EPI/COL ADP/COL.....	54
Cartucho nuevo Innovance P2Y	57
II.-JUSTIFICACIÓN.....	59
III.- OBJETIVO.....	60
III.- MATERIAL Y MÉTODOS.	60
IV.- RESULTADOS.....	65
V.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	77
VI. CONCLUSIONES.....	82
IV.-BIBLIOGRAFÍA.	84

Abreviaturas

AA	Ácido Araquidónico
ADP	Adenosin Difosfato
AINE	Antinflamatorio No Esteroideo
AM	Agregación Máxima
AMP	Adenosin Monofosfato
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosin Trifosfato
COL/ADP	Colágena/Adenosin Difosfato
COL/Epi	Colágena/Epinefrina
COX	Ciclooxigenasa
CPN	Controles de Población Normal
DE	Desviación Estándar
DG	Diacilglicerol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
EPK	Ectoprotein-Cinasa
EvW	Enfermedad de von Willebrand
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
FvW	Factor de von Willebrand
GMP	Guanosin Monofosfato
GMPc	Guanosin Monofosfato Cíclico
GP's	Glicoproteínas
GTP	Guanosin Trifosfato
IAM	Infarto Agudo al Miocardio
IP ₃	Inositol-1,4,5-Bifosfato
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad

NO	Óxido Nítrico
PA	Plasma Ajustado
PAI-1	Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1
PAM	Porcentaje de Agregación Máxima
PF4	Factor Plaquetario 4
PFA	Analizador de la Función Plaquetaria
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PGE	Prostaglandinas E
PGI ₂	Prostaciclina
PI	Fosfoinositol
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-Bifosfato
PPP	Plasma Pobre en Plaquetas
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
SCCS	Sistema Canalicular Conectado a la Superficie
SICA	Síndrome Coronario Agudo
STD	Sistema Tubular Denso
TG	Tromboglobulina
TO	Tiempo de Oclusión
tPA	Activador Tisular del Plasminógeno
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UA	Unidades Arbitrarias
VASP	Fosfoproteína Estimulada por Vasodilatadores
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo

I.- INTRODUCCIÓN.

1.- FISIOLÓGÍA DE LAS PLAQUETAS.

Las plaquetas son las células sanguíneas de menor tamaño y tienen varias características que las distinguen de otras células: 1) Las plaquetas se derivan de los megacariocitos a través de un proceso endomitótico, más que por duplicación celular directa. 2) El desarrollo de las plaquetas se realiza de manera predominante bajo el control de la trombopoyetina que, a diferencia de la eritropoyetina, se sintetiza en órganos diferentes al riñón e hígado, como el músculo liso y la médula ósea. 3) Las plaquetas son células anucleadas con forma discoide de aproximadamente $0.5 \times 3.0 \mu$ y un volumen medio de 7-11 fL. Su forma y tamaño pequeño permite que las plaquetas sean empujadas hacia los bordes de los vasos sanguíneos, colocándolas en una posición óptima para la vigilancia constante de la integridad vascular. Las plaquetas circulan en concentraciones de 150,000-450,000 células/mL. De la cantidad total de plaquetas en el cuerpo, 70% se mantiene en circulación, mientras que el resto permanece de manera transitoria pero constante en el bazo. Las plaquetas permanecen en circulación un promedio de 10 días. El bazo y el hígado se encargan de retirar a la mayoría de las plaquetas después de su senescencia, aunque una pequeña fracción se elimina constantemente como resultado de su participación en el mantenimiento de la integridad vascular.¹

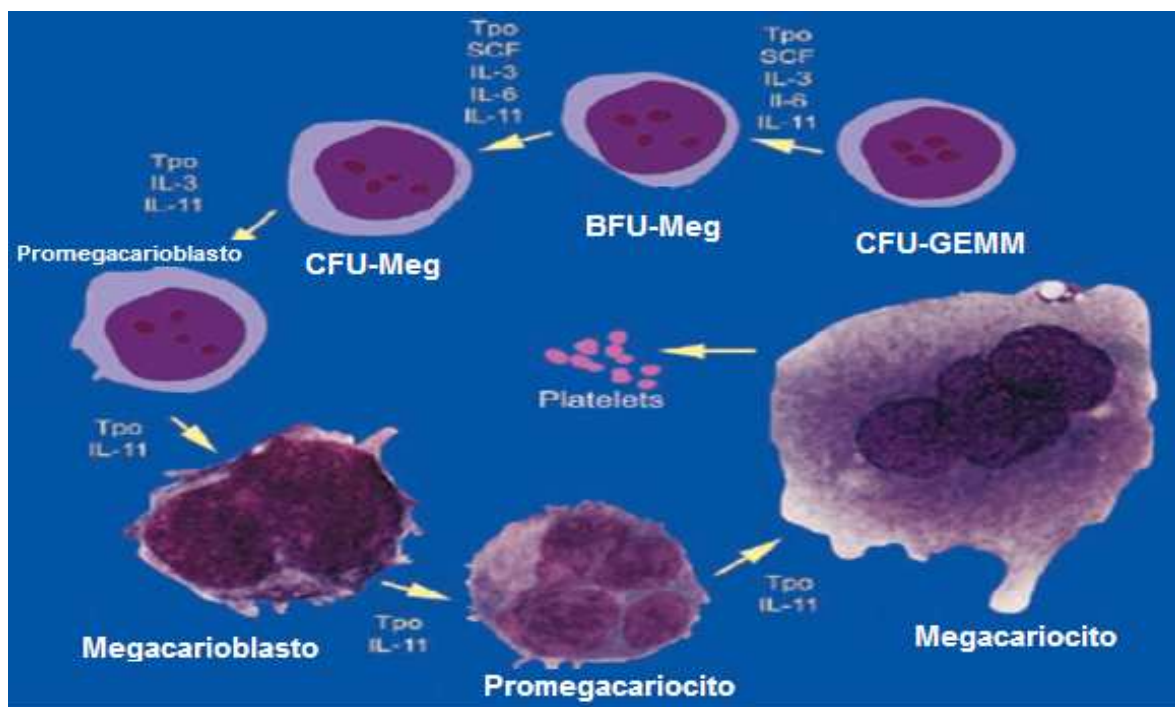


Figura 1. Maduración de los megacariocitos que dan origen a las plaquetas. Las plaquetas se liberan primero a través de las células endoteliales que recubren los senos de la médula ósea en forma de proplaquetas que luego se desdoblán en forma de plaquetas maduras. Tomado de: Italiano J. Platelets 2^{da} Edición. 2007.

2.- ESTRUCTURA DE LAS PLAQUETAS.

En frotis de sangre periférica teñidos con tinción de Wright-Giemsa, las plaquetas aparecen como pequeñas células granulares con una membrana áspera y normalmente se encuentran entre 3-10 plaquetas por campo. A pesar de su apariencia simple en el frotis las plaquetas tienen una estructura compleja.¹

Esta estructura está dividida en 4 regiones principales: superficie plaquetaria, sistemas membranosos, citoesqueleto y gránulos plaquetarios.²

2.1.- Superficie plaquetaria.

Membrana plasmática. La membrana plasmática plaquetaria separa el medio extracelular del intracelular. Presenta una estructura típica trilaminar de 20nm

de espesor, cuya apariencia no difiere de las membranas de otras células sanguíneas. Sin embargo la membrana plasmática plaquetaria es excepcionalmente compleja en cuanto a composición, distribución y función se refiere, ya que incorpora una gran cantidad de proteínas llamadas Glicoproteínas (GPs) y fosfolípidos en su bicapa lipídica, que participan en una gran variedad de eventos intra y extra plaquetarios como son la permeabilidad, la respuesta al estímulo por diversos agonistas, la adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria.

La membrana plasmática plaquetaria contiene una gran cantidad del total de los lípidos plaquetarios, aproximadamente el 60%, los cuales se encuentran distribuidos de una manera asimétrica dentro de la bicapa lipídica; las especies neutrales se encuentran principalmente en la cara externa mientras que aquellos que se encuentran en forma aniónica se concentran en la cara interna. El secuestro de las formas aniónicas que promueven la coagulación del plasma en la cara interna de la membrana junto con el complejo protrombinasa que cuando se activa se localiza en la cara externa, explican el hecho de que las plaquetas en reposo son esencialmente no reactivas cuando se genera trombina. Por otra parte las plaquetas activadas participan de manera importante en la generación de trombina a través de la interacción de los factores Xa, Va y protrombina la que se lleva a cabo en su superficie.³

Finalmente la membrana plasmática contiene sodio y calcio, además de ATPasas, que contribuyen de manera importante para mantener la homeostasis iónica.⁴

Glicocalix. Se le denomina glicocalix a la capa difusa de lípidos, azúcares y proteínas de 20nm de espesor, que recubre la superficie exterior de la membrana plasmática de las plaquetas incluyendo el SCCS (Sistema Canalicular Conectado a la Superficie), y que interactúa con el plasma y componentes celulares de la sangre y los vasos sanguíneos.

El glicocalix contiene GP's, glicolípidos, mucopolisacáridos, y proteínas absorbidas del plasma y proporciona una superficie netamente negativa, debido principalmente a residuos de ácido siálico presentes en ciertas proteínas como GPIb. Se cree que esta carga evita que las plaquetas circulantes se adhieran entre sí o a los vasos sanguíneos cuando están en reposo. Debido a que el glicocalix es rico en proteínas que participan en la adhesión plaquetaria y en receptores de agonistas que activan a las plaquetas, es considerado un componente fundamental en el desarrollo de las funciones plaquetarias.²

2.2.- Sistemas membranosos plaquetarios.

Sistema Canalicular Conectado a la Superficie (SCCS). También conocido como el sistema canalicular abierto; está formado por invaginaciones de la membrana plaquetaria que se comportan como una continuación de esta. Posee la misma composición que la membrana plaquetaria y confiere a la plaqueta su aspecto esponjoso. El SCCS tiene varias funciones a destacar. Funciona como una reserva de membrana que facilita la expansión plaquetaria y la formación de filópodos después de la adhesión plaquetaria, también funciona como un depósito de almacenamiento de membrana de GP's, como la GpIIb/IIIa cuyo número se incrementa significativamente en la superficie

plaquetaria después de su activación. El sistema también provee una ruta de liberación de gránulos durante la fase de secreción una vez que las plaquetas se activan. Finalmente, sirve como una ruta de ingreso y egreso de varias moléculas hacia la plaqueta y el plasma.⁵

Túbulos Densos. El sistema tubular denso (STD) es un sistema de canales cerrados, estrechos de aproximadamente 40 a 60 nm de diámetro. Es el principal depósito de calcio intraplaquetario. En este lugar también se localizan las enzimas del metabolismo de las prostaglandinas. Durante la activación plaquetaria, el calcio iónico se moviliza a partir del STD. La plaqueta controla sus niveles citoplasmáticos transportando el calcio desde el citoplasma hacia el STD para mantener la forma discoide plaquetaria.⁵

2.3.- Citoesqueleto plaquetario.

Tanto la forma de las plaquetas como su capacidad de contraerse y expandirse depende de una estructura citoplásmica formada de monómeros, filamentos y túbulos que constituyen al citoesqueleto. El citoesqueleto puede mediar el cambio de forma de las plaquetas, a través de la expansión y contracción de pseudópodos formados por la activación de las plaquetas, y dar soporte a la membrana plasmática para mantener la forma discoide de las plaquetas en reposo.⁶ Esta variedad de funciones se realiza por tres distintas estructuras: la primera, la región submembranosa, que se sitúa en la cara interna de la membrana plasmática; la segunda, una masa de filamentos intermedios y actina que se encuentran en el citoplasma y la tercera, la banda de microtúbulos circunferenciales los cuales envuelven las sustancias producidas

por la plaquetas en reposo. A su vez, tres diferentes tipos de proteínas conforman todas estas estructuras, las cuales son: microfilamentos de actina tienen un diámetro de 5 a 6nm, filamentos intermedios de desmina y vimentina que tienen un diámetro de 10-12 nm y los microtúbulos compuestos principalmente de tubulina cuyo diámetro es de 25 nm.²

Región submembranosa. La región submembranosa del citoesqueleto está formada básicamente de pequeños filamentos de actina que apuntalan la membrana plasmática y conecta los receptores ubicados en la superficie plaquetaria con la mayoría de los filamentos de actina citoplásmicos. Por ejemplo la región submembranosa se asocia con el dominio citoplásmico de la proteína transmembranal GPIb a través de la proteína de unión a actina. Dentro de esta región también se han identificado diversas proteínas con propiedades de señalización como espectrina, talina, pp60c-src y Rho. La región submembranosa tiene un papel importante en la expansión plaquetaria que ocurre después de la adhesión al sitio lesionado.⁷

Actina citoplásmica y filamentos intermedios. La mayoría del citoesqueleto plaquetario consta de una gran cantidad de actina, la cual comprende aproximadamente el 25% de las proteínas totales. Otras proteínas del citoesqueleto plaquetario como la tropomiosina y la α -actina, están presentes en una menor cantidad (del 2 al 5% de las proteínas totales plaquetarias). La actina se encuentra en dos formas, en forma globular (G-actina) y en forma filamentosa (F-actina) ambas conectan a la región submembranosa y a los microtúbulos. En las plaquetas en reposo, aproximadamente el 40% de la actina se encuentra en forma de microfilamentos, los cuales están dispersos en

el citoplasma, también se encuentran en muchas otras regiones subplaquetarias como en los gránulos, sin embargo como su tamaño es muy pequeño no se logran observar adecuadamente.

Filamentos intermedios. Son estructuras más resistentes y estables, ricos en vimentina y que aparentemente soportan la tensión dentro del citoplasma.

Tanto la actina como los filamentos intermedios participan en la reorganización del citoesqueleto para que la plaqueta cambie de forma una vez que se ha activado.⁸

Microtúbulos. La banda de túbulos circunferenciales, se encuentra dentro del citoplasma rodeando el contorno de la plaqueta. Se encarga de mantener la forma discoide de la plaqueta en reposo. Los túbulos están formados de dos subunidades protéicas llamadas α y β tubulina las cuales se enlazan a las proteínas asociadas a tubulina. Los microtúbulos están presentes en forma de polímeros dentro de las plaquetas que aún no son activadas. La activación plaquetaria provoca que los microtúbulos se desensamblen, provocando que la plaqueta pierda su forma discoide.⁸

2.4.-Gránulos plaquetarios y organelos.

La función plaquetaria normal requiere la amplificación de algunos estímulos para obtener una respuesta adecuada. En consecuencia las plaquetas poseen gránulos de secreción y mecanismos que sirven para este propósito, así como liberar moléculas adicionales estimulantes. Existen 3 tipos de gránulos, los gránulos α , gránulos densos y los lisosomas. Aparentemente los gránulos α y

los gránulos densos son los gránulos efectores más importantes debido a su alta reactividad y fácil disposición.⁹

Gránulos α . Existen aproximadamente 50 gránulos α por plaqueta, son los gránulos plaquetarios más abundantes, su forma aparentemente es esférica y tienen un diámetro de aproximadamente 300 nm.⁹ Se encuentran almacenados dentro de una membrana que los divide en dos diferentes zonas intragranulares las cuales varían en densidad electrónica. La región electrónica más densa es la zona más céntrica, está formado de proteínas plaquetarias específicas como la β -tromboglobulina. La región menos densa se encuentra en la periferia, es la región más cercana a la membrana granular, contiene estructuras tubulares y glicoproteínas de adhesión como el Factor de von Willebrand (FvW). Se ha sabido por muchos años que las plaquetas tienen la capacidad de tomar algunos componentes del medio externo e introducirlos a su citoplasma; recientes investigaciones han demostrado que pueden incorporar proteínas plasmáticas específicas. En este punto se puede clasificar a las diversas proteínas que se encuentran en los gránulos α de acuerdo a diversos aspectos como su origen (megacariocítico o no megacariocítico), localización dentro del gránulo y función (adhesiva o mitogénica).²

Tres proteínas, β -tromboglobulina, Factor Plaquetario 4 (PF4) y la trombospondina están altamente concentradas en los gránulos α y son sintetizadas en los megacariocitos. Las primeros dos, β -tromboglobulina y PF4 muestran homología en la secuencia de aminoácidos y de forma adicional características de localización (dentro de la región de alta densidad electrónica), propiedades de unión a la heparina y miembros de la familia CXC

de las quimiocinas. Juntas constituyen aproximadamente el 5% de las proteínas plaquetarias totales y debido a su especificidad (solamente se producen en los megacariocitos) pueden servir como marcador de plaquetas en suero o en plasma. El tercer miembro de este grupo, la trombospondina, es una lectina endógena plaquetaria, comprende el 20% de las proteínas plaquetarias totales, se libera en respuesta a la trombina y participa en la formación del tapón plaquetario.⁹

El FvW es sintetizado por los megacariocitos y está presente en la zona periférica de los gránulos α (zona de baja densidad electrónica), su localización es similar a la que tiene dentro de los cuerpos de Weibel-Palade en las células vasculares endoteliales. El factor V se encuentra en los gránulos α unido a una proteína llamada multimerina dentro de la zona periférica.⁹ Existen otras proteínas de la coagulación dentro de los gránulos α como el fibrinógeno que son incorporados del plasma, pero que aparentemente no se sintetizan por el megacariocito. Dos diferentes proteínas granulares de membrana, P-selectina y la proteína granular de membrana 33 han demostrado tener la propiedad de ser translocadas de la membrana de los gránulos a la membrana plasmática después de la activación plaquetaria. Finalmente, existen otras proteínas que han sido localizadas sólo en la superficie de los gránulos α de las plaquetas, incluyendo CD9, PECAM-1, Rap 1b, GPIb-IX-V y osteonectina.²

Pequeñas cantidades de prácticamente todas las proteínas plasmáticas, como la albumina, IgG, fibronectina y precursor de la proteína β -amiloide pueden encontrarse en el interior de los gránulos α . Además de varios factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, TGF- β 1 y

factor de crecimiento vascular endotelial. Estos gránulos, aparentemente tienen una participación muy importante en la actividad mitogénica de las plaquetas².

Gránulos densos. Podemos encontrar aproximadamente cinco gránulos densos por plaqueta.⁹ Este tipo de gránulos tienen una gran densidad electrónica, son fácilmente apreciables en un microscopio electrónico debido a su distintiva apariencia de “ojo de toro”. Con un diámetro aproximado de 250nm, estos gránulos son un gran reservorio de ADP, un agonista crítico para la activación de las plaquetas que amplifica el efecto de otros estímulos. Los gránulos densos también son ricos en ATP, pirofosfato, calcio y serotonina, tienen además, una menor cantidad de GTP, guanosin difosfato y magnesio. Los nucleótidos de adenina son sintetizados y secretados por los megacariocitos, mientras que la serotonina es incorporada a partir del plasma por las plaquetas circundantes. Hay más ADP que ATP en los gránulos densos, y ambos pueden conducir a la formación de adenosin monofosfato (AMP). A su vez, el AMP puede ser desfosforilado para formar adenosina o ciclado y forma AMPc un inhibidor de la respuesta estimuladora de las plaquetas. La membrana de los gránulos densos contiene P-selectina y granulofisina.³

Lisosomas. Los lisosomas son pequeñas vesículas acidificadas, de aproximadamente 200nm de diámetro que son identificables solo con tinciones específicas para la fosfatasa ácida o la arilsulfatasa o por inmunocitoquímica para catepsina D y proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP-1/LAMP-2) que se expresan en la membrana plasmática después de la activación.⁹ Los lisosomas son los únicos gránulos plaquetarios que contienen hidrolasas con un pH óptimo de 3.5 a 5.5, incluyendo β -glucoronidasa,

catepsinas, aril sulfatasa, β -hexosaminidasa, β -galactosidasa, heparitinasa y β -glicerofosfatasa.⁹ Los lisosomas constitutivos son liberados más lentamente e incompletamente (aproximadamente el 60%) que los componentes de los gránulos α y los gránulos densos después de la estimulación plaquetaria, su liberación requiere de agonistas fuertes como la trombina o la colágena sugiriendo que quizá tienen un papel más importante en la lisis del trombo que en la respuesta hemostática inmediata².

Organelos: microperoxisomas, vesículas recubiertas, mitocondrias y glucógeno.

Microperoxisomas: son gránulos pequeños de aproximadamente 90nm de diámetro, cuya presencia puede ser demostrada por su actividad de catalasa al generar diaminobenzidina alcalina. Estas estructuras pueden participar en la síntesis del factor de activación plaquetaria, sin embargo su destino final dentro del citoplasma es desconocido.¹⁰

Vesículas recubiertas: son organelos plaquetarios que tienen un diámetro aproximado de 70-90 nm, distinguibles por su densidad electrónica. Su superficie polihédrica está compuesta de clatrina, tinciones especiales revelan que la cubierta que está en el plasma y la membrana del SCCS es la misma que se encuentra en estas vesículas, que transportan componentes del plasma a los gránulos plaquetarios, el número de vesículas en las plaquetas aumenta después de la estimulación con ADP.¹⁰

Mitocondrias: las mitocondrias de las plaquetas son similares a las encontradas en otros tipos de células, con la excepción de que su tamaño es más pequeño.

En los humanos hay aproximadamente siete por plaqueta, en ellas se lleva a cabo la respiración celular y el ciclo del ácido cítrico.¹⁰

Glucógeno: se encuentra en partículas pequeñas o en masas de partículas estrechamente unidas, juegan un papel importante en el metabolismo plaquetario.³

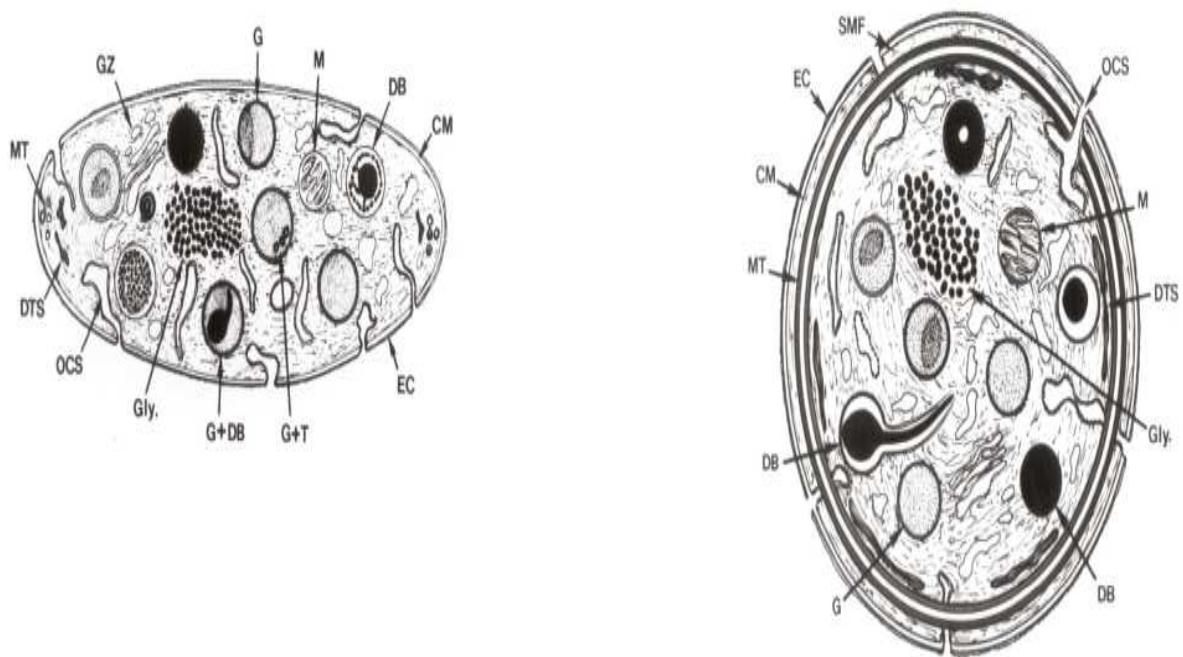


Figura 2. Características ultraestructurales observadas en secciones poco densas de plaquetas discoides cortadas en sección cruzada. EC= capa exterior, CM= membrana unitaria trilaminar, SMF= submembranas que contienen filamentos especializados que conforman la pared de la plaqueta y revisten los canales del sistema canalicualr abierto conectado a la superficie (SCCS), MT=Banda circunferencial de microtúbulos, Gly= Glucógeno, M=mitocondrias, G=gránulos α y DB= gránulos densos. Tomado de: White J. Hemostasis and Thrombosis, 3^{ra} Edición 1994.

3.- FUNCIÓN DE LAS PLAQUETAS.

Las plaquetas están implicadas en varios aspectos de la hemostasia. Una de las funciones que desempeñan es la vigilancia pasiva del recubrimiento endotelial de los vasos sanguíneos respecto a posibles brechas y fracturas.

Aunque la naturaleza exacta de esta acción es un tanto controvertida, se ha visto que las plaquetas mantienen la continuidad o integridad de los vasos al llenar las brechas causadas por la separación de las células endoteliales. Se adhieren a las fibras de colágena subyacente del endotelio expuesto y evitan el escape de la sangre. La disminución en el número de plaquetas resulta en escapes de sangre a través de estas brechas hacia el interior de los tejidos.

Cuando se producen lesiones y hay una ruptura real en la continuidad del recubrimiento de los vasos, las plaquetas reaccionan para formar un agregado conocido como tapón hemostático. La hemorragia se detiene debido a que las aberturas en los vasos se llenan mecánicamente con la masa plaquetaria.

Después de la formación de este tapón, los fosfolípidos de la membrana de las plaquetas que conforman el tapón hemostático proporcionan una superficie de reacción a los factores de la coagulación que intervienen en la hemostasia secundaria y cuyo objetivo es convertir el fibrinógeno en fibrina para finalmente reparar el sitio lesionado.¹¹

Como cuarta función, las secreciones de las plaquetas ayudan a reparar los tejidos lesionados. El factor de crecimiento derivado de plaquetas, mitógeno almacenado en los gránulos alfa, estimula a las células musculares lisas y posiblemente a los fibroblastos a multiplicarse y sustituir a las células dañadas por la lesión.

4.- FASES DE ACTIVACIÓN DE LAS PLAQUETAS.

En un estado fisiológico normal, las plaquetas circulan sin adherirse al endotelio vascular sano. Cuando hay alteraciones en la integridad del endotelio vascular o debido a la fricción provocada por la fuerza de cizalla del flujo

sanguíneo, las plaquetas se activan y desempeñan un papel esencial en las respuestas tanto benignas como patológicas. La hemostasia primaria es el proceso inicial de la hemostasia y tiene el objeto de crear un tapón plaquetario en respuesta a un daño endotelial.¹² El proceso de transformación de plaquetas inactivas en un tapón plaquetario bien formado ocurre a lo largo de un *continuum*, pero puede dividirse en tres etapas: (1) adhesión (2) activación y (3) secreción y agregación.

4.1.-Adhesión plaquetaria.

La adhesión de las plaquetas es el primer paso en la formación del tapón plaquetario. En condiciones normales, las plaquetas no tienen contacto con la matriz de tejido conectivo del subendotelio vascular. Cuando ocurre una lesión en la pared de un vaso, quedan expuestos componentes subendoteliales (por ejemplo, colágena, FvW, fibronectina y laminina). El FvW facilita la adhesión inicial al unirse al complejo glicoproteínico GPIb/IX/V de la plaqueta, particularmente, en presencia de fuertes fuerzas de cizalla. Estas interacciones permiten que la velocidad de circulación de las plaquetas disminuya lo suficiente para que tengan lugar otras interacciones de unión.¹³ En particular, la interacción inicial entre colágena y GPVI induce un cambio conformacional (activación) en las integrinas de las plaquetas GPIIb/IIIa y GPIa/IIa. El FvW y el colágeno forman sólidas uniones con GPIIb/IIIa y GPIa/IIa respectivamente, anclando a las plaquetas en el lugar de la lesión formando una primera capa que evita la fuga de sangre en la lesión del endotelio.¹⁴

4.2.-Activación plaquetaria.

La adhesión de las plaquetas a las fibras de colágena a través del FvW desencadena una serie de cambios morfológicos y funcionales conocidos como activación plaquetaria.¹⁴ La activación de las plaquetas es un proceso complicado que incluye: 1) cambios en la bioquímica metabólica, 2) cambios en la forma, 3) cambios en los receptores de superficie, y 4) cambios en la orientación de los fosfolípidos de membrana. Sólo las plaquetas activadas tienen la capacidad de proceder con los pasos subsecuentes en la formación del tapón plaquetario.¹¹

1) Los cambios bioquímicos se inician cuando el FvW y/o la colágena, entran en contacto con el receptor GPIb en la superficie de la plaqueta. Las enzimas de membrana se activan y fragmentan fosfolípidos específicos. Los productos resultantes son segundos mensajeros que penetran en el citoplasma de la plaqueta y transfieren la señal al interior de la célula. Muchos conjuntos de reacciones se estimulan subsecuentemente por los segundos mensajeros. Las tres enzimas más importantes presentes en las plaquetas son: la fosfolipasa C, la fosfolipasa A₂ y la adenilato ciclasa. Los productos de las tres enzimas causan un movimiento rápido de los iones de calcio intracelular a partir de los sitios de almacenamiento en el sistema tubular denso, permitiendo que se incrementen las concentraciones de calcio iónico en el citoplasma, que en reposo suelen ser bajas. Muchos sistemas celulares que están inactivos en las plaquetas en reposo se activan por la presencia de los iones de calcio. Existe una correlación directa entre la cantidad de calcio citoplásmico y el grado de estimulación.¹⁵

El sustrato de la fosfolipasa C es un derivado del fosfatidilinositol (PI). El PI es uno de los fosfolípidos que se encuentran en mayor cantidad en la cara interior de la membrana lipídica. Uno o dos grupos de fosfatos pueden agregarse enzimáticamente al PI a través del ATP en las posiciones 4 y 5 del inositol, para formar fosfoinositol-4monofosfato o fosfoinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) denominados también difosfatidilinositol y trifosfatidilinositol, respectivamente. La fosfolipasa escinde al PIP_2 para formar dos compuestos, cada uno causa diferentes efectos. El primero, el inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) estimula una serie de reacciones que dan lugar a la liberación de iones de calcio del sistema tubular denso. El segundo compuesto es el diacilglicerol (DG), que activa otra enzima llamada proteín-cinasa C, la cual fosforila a otras proteínas. La fosforilación es un proceso regulador en todas las células que da lugar a la activación de algunas proteínas y a la inactivación de otras. En la plaqueta, se considera que conduce a pasos subsecuentes como la secreción de los gránulos y a la activación del receptor del fibrinógeno, la GPIIb/IIIa que le confiere gran afinidad sobre el fibrinógeno.¹⁴

La fosfolipasa A_2 se estimula por el incremento del calcio citoplásmico originado por el IP_3 . La fosfolipasa A_2 hidroliza al ácido araquidónico (AA) a partir del segundo carbono del esqueleto del fosfatidilinositol y de la fosfatidilcolina. El ácido araquidónico es un precursor de una gran cantidad de moléculas presentes en nuestro organismo. En la plaqueta, el tromboxano A_2 (TxA_2) se sintetiza a partir del ácido araquidónico por acción de la ciclooxigenasa (COX) y tromboxano sintetasa. Dentro de la plaqueta el tromboxano A_2 estimula la secreción de los gránulos de ésta. El tromboxano A_2 además, puede difundir al exterior de la plaqueta y favorecer la vasoconstricción.¹⁶

La tercera enzima, la adenilato ciclasa es estimulada por los agentes inhibidores de la agregación plaquetaria y se bloquea por muchos agonistas promotores de dicha agregación. Las concentraciones de calcio aumentan por esta acción, pero no es claro el mecanismo mediante el cual sucede.¹⁴

La activación continúa dando lugar al cambio de forma de la plaqueta cuando el nivel de calcio alcanza un umbral.

2) Uno de los eventos más dramáticos durante la activación de las plaquetas es la metamorfosis que ocurre cuando las plaquetas se adhieren y expanden sobre las fibras de colágena expuestas, gracias a factores solubles como la trombina o el ADP. En cada caso las plaquetas pierden su forma discoide distintiva y adquieren una morfología irregular con múltiples proyecciones filopoidales. Esta transformación está asociada en gran parte al rearrreglo del citoesqueleto plaquetario. La red citoplasmática de actina, el borde de membrana asociado a actina y la banda marginal conformada por microtúbulos son las encargadas de darle forma tanto a las plaquetas en reposo como a las plaquetas activadas.

La red citoplasmática de actina está compuesta de filamentos de actina y proteínas asociadas. En las plaquetas en reposo 40 al 50% de la actina se encuentra en forma de F-actina, el resto se encuentra en forma de G-actina.

Este proceso es regulado en parte por el incremento en los niveles de PIP_2 que acompaña la activación plaquetaria. Al mismo tiempo la miosina es fosforilada por la cadena ligera de la miosin cinasa y comienza a asociarse con la F-actina, formando filamentos que son anclados a la membrana plasmática de la plaqueta a través del complejo GPIb/V/IX

El borde de membrana del citoesqueleto está compuesto de actina, filamina, talina, vinculina, espectrina, α -actina y varias glicoproteínas de membrana. La filamina es una proteína elongada de 280 Kd presente en las plaquetas y que funciona como proteína de unión a actina. En las plaquetas en reposo la filamina forma parte de una matriz semirrígida que ayuda a mantener la forma discoide de la plaqueta y limita el movimiento lateral de GPIIb. Esta función es análoga a la que realiza la espectrina en el eritrocito. Cuando las plaquetas son activadas, los filamentos de actina forman un agregado de proteínas de unión a actina, posteriormente se libera calcio citosólico que activa a la calpaína, la cual escinde proteínas de unión a actina cortando el vínculo con GPIIb.

El tercer mayor elemento estructural en las plaquetas es la banda marginal de microtúbulos. Estos microtúbulos encierran el perímetro de la plaqueta para ayudar a mantener su forma discoide. Durante la activación plaquetaria los microtúbulos se contraen, permitiendo que las plaquetas cambien de forma.

3) El tercer elemento de la activación da lugar a la aparición del receptor GPIIb/IIIa, que se une al fibrinógeno. Este receptor se encuentra oculto en las plaquetas inactivas, pero aparece muy pronto después de la activación con cualquier agonista. Las plaquetas son capaces de enlazar fibrinógeno sólo después de que el receptor GPIIb/IIIa es activado. Para que el receptor se active y se lleve a cabo este enlace se requiere la presencia de calcio.⁹

4) El cuarto aspecto de la activación es un cambio en la superficie de la membrana plaquetaria, que permite que las proteínas generadoras de fibrina (los factores de la coagulación) se anclen a ella. Esta función se conoce como actividad procoagulante de la plaqueta.¹⁷

4.3.- Agregación primaria, Secreción de gránulos y agregación secundaria.

Agregación. Después de que las plaquetas se activan, el tapón hemostático continúa en una fase conocida como agregación. La agregación de las plaquetas se refiere a la adhesión de las plaquetas entre sí. Las plaquetas que no se unen a las fibras de colágena expuestas en el sitio de la lesión, se activan por contacto con agonistas liberados de los gránulos de las plaquetas que ya están unidas al sitio lesionado. Con esta activación las plaquetas “nuevas” sufren cambio de forma y activación de su receptor GPIIb/IIIa y se agregan a las plaquetas que se encuentran adheridas a las fibras de colágena.⁹

La agregación se produce en dos fases llamadas primaria y secundaria. Durante la agregación primaria las plaquetas se adhieren laxamente entre sí, ante un estímulo débil, esta agregación es reversible. La agregación secundaria por su parte, tarda más tiempo y comienza cuando las plaquetas sintetizan tromboxano A_2 y liberan su propio ADP y otras moléculas que se encuentran almacenados en sus gránulos. Las sustancias liberadas se vuelven agonistas que continúan el proceso de estimulación. Si las plaquetas son incapaces de liberar ADP o de sintetizar tromboxano A_2 , o ambos, no se produce la agregación secundaria. El resultado puede ser que la hemorragia de una herida tarde más tiempo en detenerse.¹¹

Se necesita fibrinógeno y calcio extracelular para que se produzca la agregación. Ambos son elementos constitutivos del plasma y ambos son liberados por los gránulos de almacenamiento de las plaquetas para proporcionar altas concentraciones en el área de la lesión. La función del fibrinógeno es formar puntos o sitios de unión entre dos plaquetas adyacentes

gracias a su estructura molecular, que consta de dos pares de tres cadenas polipeptídicas, llamadas alfa, beta y gama. Un juego de las tres cadenas polipeptídicas forma un dominio D en cada extremo de la molécula. Las seis cadenas se unen en el centro de la molécula en el dominio E.¹⁸ Una molécula de fibrinógeno se puede unir al receptor GPIIb/IIIa de dos plaquetas diferentes a través de los sitios de enlace en las cadenas alfa y gamma de su dominio. El extremo terminal carboxilo de la cadena gamma y dos sitios de la cadena alfa del fibrinógeno se enlazan a secuencias de aminoácidos cortas específicas y complementarias en el receptor.¹⁹

Secreción. Después de la adhesión, cambio de forma y agregación primaria, las plaquetas comienzan a liberar en el área circundante su contenido granular. Este proceso es conocido como secreción. La secreción depende de energía y requiere de ATP. Se realiza gradualmente durante un cierto periodo y antes o concurrentemente con la agregación secundaria.

La secreción se produce de dos maneras. En uno de los mecanismos, el sistema canalicular se fusiona con las membranas de los gránulos que se han centralizado profundamente en el interior de la plaqueta. Enseguida, los contenidos se expulsan a través del SCCS al exterior. De manera alterna, las membranas de algunos gránulos se fusionan entre sí y después lo hacen con la membrana plasmática. De esta otra forma, los gránulos son liberados al exterior de la plaqueta. Algunas de las sustancias liberadas son agonistas que estimulan receptores adicionales de membrana. La estimulación de dichos receptores provoca un aumento en los niveles de calcio y en seguida se producen mayores niveles de liberación de gránulos, hasta que finalmente las plaquetas quedan degranuladas.²⁰

Las sustancias liberadas por las plaquetas tienen diversas funciones, algunas definidas y la mayor parte de ellas desconocidas. Promueven la formación del tapón de plaquetas al estimular que las plaquetas se adhieran, secreten y agreguen. La liberación al tejido circúndate del ADP de los gránulos densos se considera de importancia primaria en la estimulación continua y en el reclutamiento de nuevas plaquetas al agregado. Después de una lesión, la principal fuente de ADP extracelular puede ser el tejido lesionado y las células endoteliales. El ADP extracelular se enlaza a un receptor de membrana específico de la plaqueta que se encuentra acoplado a la enzima adenilato ciclasa. Un efecto de este enlace provoca que las reservas de calcio intracelular se desplacen de los sitios de almacenamiento al citoplasma. El aumento de calcio citoplásmico hace que las plaquetas liberen a su exterior su propio ADP a partir de los gránulos densos. Otro efecto del enlace del ADP a su receptor es promover que los receptores del fibrinógeno (GPIIb/IIIa) incrementen su número en la superficie de la plaqueta, los receptores a su vez cambian de un estado de baja afinidad a alta afinidad por el fibrinógeno. Al continuar la liberación, la cantidad de ADP extracelular aumenta y se estimulan más receptores de plaqueta, lo que da lugar a mayores concentraciones internas y externas de calcio.¹³

Los gránulos α contienen una amplia variedad de proteínas, algunas de las cuales son específicas de las plaquetas y otras, como el fibrinógeno son similares a las proteínas hemostáticas que se encuentran en el plasma.

Las proteínas específicas de las plaquetas son el PF4, la β -tromboglobulina (β TG) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El PFA4 se conoce como factor neutralizante de la heparina, tienen actividad quimiotáctica

para neutrófilos, monocitos y fibroblastos. La función de β TG es incierta pero se cree que atrae fibroblastos quimiotácticamente por lo cual puede promover la reparación de la herida. El PDGF es un mitógeno que también contribuye a la reparación del tejido dañado.

La trombospondina es otra proteína liberada de los gránulos α , pero no es específica de las plaquetas. Se sintetiza por muchas otras células, incluso células endoteliales, y se encuentra en el tejido conjuntivo vascular. Puede actuar en la agregación y en la adhesión de las plaquetas.

El FvW, Factor V y el fibrinógeno son ejemplos de proteínas en los gránulos α que son similares a las proteínas hemostáticas del plasma.²⁰

5.- RETRACCIÓN DEL COÁGULO.

Las plaquetas generan la fuerza necesaria para la retracción del coágulo de fibrina, contribuyendo de esta forma a la cicatrización de las heridas. La retracción del coágulo requiere un intacto citoesqueleto plaquetario.²¹

Se estima que la retracción del coágulo se produce por la vinculación de los pseudópodos de las plaquetas adyacentes entre sí con las fibras de fibrina. La actina, la miosina y otras proteínas contráctiles que se encuentran dentro del citoesqueleto plaquetario hacen que las plaquetas se contraigan. *In vivo*, el resultado de la retracción del coágulo es una masa cohesiva de plaquetas y fibrina que sella la pared del vaso lesionado. La masa de plaquetas-fibrina estabilizada permanece en el sitio hasta que la reparación de la herida por los fibroblastos produce un cierre permanente de la misma. La contracción probablemente involucra al citoesqueleto plaquetario cuya composición es muy similar al encontrado en las células musculares lisas. La integrina GpIIb/IIIa es

también necesaria debido a que es la molécula que ancla las plaquetas a la fibrina. Si GpIIb/IIIa es bloqueada por anticuerpos o péptidos solubles que compiten por el sitio de unión, entonces, la retracción del coágulo se inhibe.

La interacción de GPIIb/IIIa con la fibrina durante la retracción del coágulo difiere de la interacción con el fibrinógeno durante la agregación plaquetaria. Esta diferencia no es causada por la pérdida de fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno, ya que aunque la fibrina no cuenta con los fibrinopéptidos A y B, si mantiene dos sitios de unión a la integrina GpIIb/IIIa encontrados en el fibrinógeno. Cuando uno de estos sitios, la secuencia peptídica AGDV en la cadena α del fibrinógeno se elimina, la agregación plaquetaria se interrumpe, mientras la retracción del coágulo se lleva a cabo de manera normal. Esto sugiere que la agregación plaquetaria es mediada por la unión de la cadena α del fibrinógeno a la integrina GPIIb/IIIa, mientras que la retracción del coágulo es mediada por la unión de la secuencia peptídico RGD de la cadena α del fibrinógeno.¹¹

La fibrinólisis del coágulo ocurre por acción de la plasmina, cuya actividad se inicia por el activador tisular del plasminógeno (t-PA por sus siglas en inglés). Los coágulos que son ricos en plaquetas son más resistentes a la fibrinólisis posiblemente por la liberación del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Además, la fibrina que forma parte de la densa red que se encuentra unida a la superficie plaquetaria es más resistente a la fibrinólisis que la fibrina que no se encuentra unida a la superficie plaquetaria, gracias a la unión al receptor GPIIb/IIIa, el desacoplamiento de la fibrina de la integrina hace a la fibrina más susceptible a la lisis.²¹

HEMOSTASIA PRIMARIA

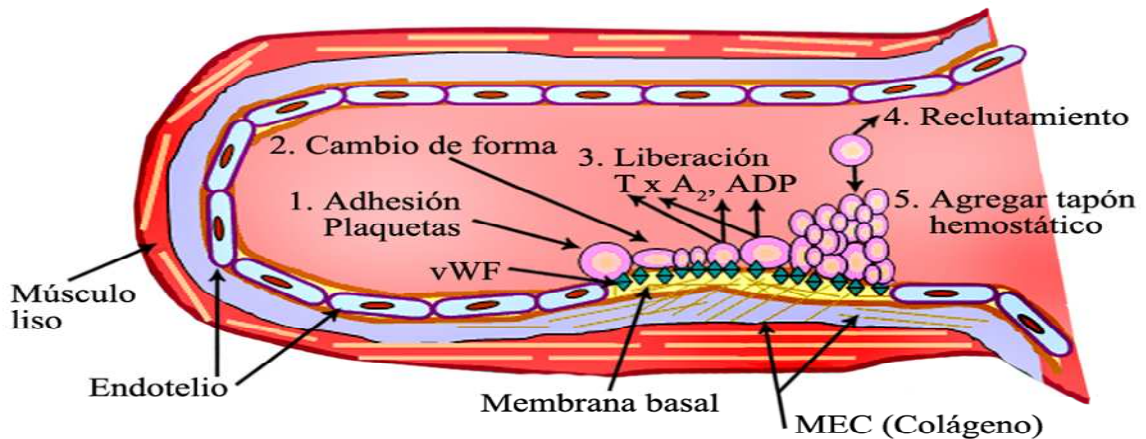


Figura 3. Participación de las plaquetas durante la lesión del endotelio. vWF= Factor de von Willebrand, TxA_2 = Tromboxano A_2 , ADP= Adenosin difosfato , MEC= Matriz extracelular subendotelial. Tomado de: Pérez A. El estomatólogo su relación con el dolor y la sangre, capítulo III Hemostasia natural.

6.- Mecanismos regulatorios de la activación y agregación plaquetaria.

La formación del tapón plaquetario en el sitio vascular lesionado es un proceso altamente localizado. El tapón plaquetario normalmente no se forma ni crece de manera descontrolada para no bloquear el flujo sanguíneo. Además, las plaquetas no se adhieren a un vaso sanguíneo ileso. Existen mecanismos que evitan que las plaquetas se adhieran a sitios ilesos en el endotelio y que limitan la formación del tapón plaquetario.²² Estos mecanismos incluyen la producción de prostaglandinas inhibitorias, óxido nítrico, un sistema ectoprotein cinasa plaquetario y el reciclamiento de GPIIb/IIIa.²¹

6.1.-Prostaglandinas inhibitorias.

PGE1, PGE2 y PGI2 (también llamada prostaciclina), inhiben la agregación plaquetaria inducida por la mayoría de los agonistas dependientes de AMPc. La prostaciclina y la PGE2 se producen por el endotelio y otros tejidos. Estas prostaglandinas interactúan con los receptores acoplados a proteínas G en la superficie de la plaqueta, de esta forma, se activa la adenilato ciclasa, que induce la formación de AMPc. La producción de AMPc se regula por la actividad de la fosfodiesterasa, que disminuye los niveles de AMPc dentro de la plaqueta, degradándolo. La actividad de la fosfodiesterasa es inhibida por una serie de fármacos, como la teofilina y dipiramida, provocando elevación intracelular en los niveles de AMPc. El AMPc activa a las cinasas dependientes de AMPc (también llamadas cinasas A o proteínas cinasas A), las cuales fosforilan proteínas específicas, lo que probablemente inhibe la reactividad plaquetaria.²³ El mecanismo exacto por el cual las cinasas A inhiben la reactividad plaquetaria no es del todo claro, sin embargo existen varias teorías, por ejemplo, recientemente se demostró que niveles elevados de AMPc inhiben al receptor plaquetario IP3, lo que probablemente provoca una disminución en los niveles intracelulares de Ca²⁺. Niveles altos de AMPc también inhiben la actividad de las enzimas fosfolipasa C y fosfolipasa A₂. Adicionalmente, PGE1 induce la fosforilación de GPIIb/IIIa para inhibir la polimerización de actina lo que ocurre en las plaquetas estimuladas con colágeno.²⁴

6.2.- Óxido Nítrico.

El óxido nítrico se forma por células endoteliales, plaquetas y otras células a partir de L-arginina, por la óxido nítrico sintetasa.²⁵ El NO se produce en

respuesta a cambios en la presión arterial y agonistas plaquetarios como la trombina o el ADP y fácilmente difunde al endotelio, a través de la membrana plasmática plaquetaria. El NO inhibe tanto la activación como la agregación de conglomerados plaquetarios, pero a diferencia de las PGI₂ o PGE₁, no es dependiente de los niveles de GMPc. Debido a que la actividad de la NO sintasa mejora durante la activación plaquetaria, ha sido sugerido que la producción de NO le provee a las plaquetas un medio para limitar la agregación plaquetaria. Varios grupos han demostrado un sinergismo inhibitorio del NO y la protaciclina en la activación plaquetaria.²⁶

6.3.- Internalización de GPIIb/IIIa.

La integrina GPIIb/IIIa se internaliza tanto en las plaquetas en reposo como en las plaquetas activadas. Sin embargo, en las plaquetas activadas la GPIIb/IIIa puede unir fibrinógeno y rápidamente internalizarlo. Plaquetas activadas que no forman parte de un agregado, quitan el fibrinógeno de su superficie y regresan a un estado no adhesivo. El destino exacto del fibrinógeno internalizado no es del todo claro, pero varias evidencias sugieren que al menos una porción es transportado a los gránulos α tanto de los megacariocitos como de las plaquetas. De esta forma, pacientes con trombastenia de Glazman tipo 1, que carecen completamente de GPIIb/IIIa, no tienen fibrinógeno en sus gránulos α . La internalización del fibrinógeno probablemente si ocurre *in vivo*, debido a que se ha reportado que transfusiones de plasma que contienen fibrinógeno a pacientes con afibrinogenemia restauran más rápidamente los niveles de fibrinógeno que el que se podría explicar por la formación de nuevas plaquetas. De esta forma el fibrinógeno internalizado provee un mecanismo de transporte

hacia los gránulos α y un mecanismo antitrombótico que implica la eliminación del fibrinógeno en la superficie de la plaqueta.²⁷

6.4.- Ectoprotein cinasa .

Una protein cinasa altamente activa denominada ectoproteincinasa (EPK) ha sido particularmente caracterizada en la superficie de las plaquetas en reposo, aparentemente regula de manera negativa la activación plaquetaria. El ATP se secreta a partir de los gránulos densos de las plaquetas o se libera de otras células circulantes y sirve como sustrato de esta cinasa. La EPK es una treonin-serin cinasa y muestra dependencia de Ca^{2+} , fosforila dos proteínas de 39KDa y 42KDa. Esta enzima se atenúa generalmente durante la activación plaquetaria por varios agonistas. El ligando específico de GPIV (CD36), un sitio de unión plaquetaria para la trombospondina y la colágena, se controla por la fosforilación de un ectodominio de GPIV. Aunque la enzima que fosforila a GPIV en la superficie de la plaqueta es desconocida, la EPK es una candidata. Recientemente ha sido demostrado que CD36 también se fosforila por una EPK dependiente de AMPc. De esta forma, la fosforilación celular tiene el potencial de regular la respuesta plaquetaria a varios agonistas.²¹

7.- PATOLOGÍAS.

Las plaquetas desempeñan un papel importante en la hemostasia, y defectos en la función plaquetaria o disminución en la cuenta puede conducir a una diátesis hemorrágica. Las trombopatías, son aquellas enfermedades originadas por algún tipo de trastorno en la función plaquetaria. Se trata de patologías en las que el número de plaquetas es normal, pero no se llegan a formar tapones

hemostáticos funcionales. Los defectos de la adherencia, la agregación y actividad procoagulante de las plaquetas pueden ser hereditarios o adquiridos, es precisamente en estas características en la que se basa su clasificación:¹

7.1. Trastornos adquiridos de la función plaquetaria.

Los trastornos adquiridos de la función plaquetaria se clasifican ampliamente en los provocados por defectos intrínsecos a las plaquetas y los causados por defectos extrínsecos a ellas.¹ Fármacos y muchas enfermedades sistémicas pueden dar lugar a trastornos adquiridos de la función plaquetaria. Se ha informado que más de 100 fármacos entre ellos la Aspirina, ciertos alimentos, especias y vitaminas afectan la función plaquetaria. En el caso de casi todos los agentes, los datos se limitan a descripciones de pruebas de agregación plaquetaria *in vitro* anormales o un tiempo de hemorragia prolongado, lo que podría no tener relevancia clínica. También se ha informado de disfunción plaquetaria en pacientes con uremia, disfunción hepática, procedimientos de desvíos coronarios, sepsis/infecciones, leucemia y padecimientos como coagulación intravascular diseminada (CID). Es importante subrayar que la Aspirina, y otras causas de función plaquetaria anormal (insuficiencia renal crónica y cirugía cardíaca) pueden exacerbar considerablemente la hemorragia en pacientes con trastornos plaquetarios subyacentes.¹⁹

Tabla 1. Trastornos de la función plaquetaria que se presentan con síntomas hemorrágicos.				
Tipo de disfunción plaquetaria	Enfermedad sistémica	Gravedad de la hemorragia	Mecanismo potencial	Anormalidades de la agregación plaquetaria
Trastornos intrínsecos de la función plaquetaria	Trastornos mieloproliferativos crónicos	De leve a moderada	Defecto a nivel del megacariocito afectado: 1) Peroxidación de lípidos y respuestas al tromboxano A2 anormales 2) Captación y almacenamiento de serotonina inferior al normal 3) Expresión anormal de receptores Fc 4) Defecto combinado en la expresión y activación en membrana de los complejos GPIIb/IIIa	Agregación inconsistente o deficiente
	Síndrome mielodisplásico/leucemias	De leve a Moderada	Defectos en la megacariopoyesis: 1) Sistema canalicular dilatado y formación microtubular anormal 2) Posible formación de gránulos reducidos o gigantes debida a la fusión de varios gránulos individuales 3) Defecto adquirido en la membrana, con 4) expresión anormal de la glicoproteína	Agregación inconsistente o defectos de agregación múltiples. ↓
Trastornos extrínsecos de la función plaquetaria	Uremia	Leve	1) ↓ Número y función normales o del receptor GPIb/IX 2) ↓ agregación plaquetaria inducida por cizallamiento con elevadas tasas de cizallamiento, posiblemente debidas a proteólisis de la metaloproteasa del FvW ADAMTS13 3) Defectos en la función del receptor dependiente de la activación de la GPIIb/IIIa para la unión de fibrinógeno y FvW 4) Defectos en la secreción plaquetaria de ADP	agregación con colágeno, ADP y epinefrina ↓
	Disfunción hepática	De leve a grave	1) Alteración del metabolismo del palmito y del estereato en la membrana plaquetaria	agregación al colágeno, trombina, ristocetina; no hay fases secundarias de agregación después de la agregación con ADP y epinefrina

Tomado de: Sharathkumar A. Tratamiento de la Hemofilia 2008, 19,13.

Tabla 1: Trastornos de la función plaquetaria que se presentan con síntomas hemorrágicos (continuación).

Sitio de la disfunción plaquetaria	Enfermedad sistémica	Gravedad de la hemorragia	Mecanismo potencial	Anormalidades de la agregación plaquetaria
Trastornos extrínsecos de la función plaquetaria	Paraproteïnemia	De leve a grave	1) Adherencia no específica de inmunoglobulinas a la superficie plaquetaria +/- interacciones específicas antígeno/anticuerpo	Agregación deficiente
	Coagulación intravascular Diseminada		1) Activación plaquetaria por trombina Trastorno de almacenamiento adquirido	↓ agregación
	Desvío cardiopulmonar		1) Activación y fragmentación plaquetaria debida a la hipotermia, contacto con superficies sintéticas cubiertas de fibrinógeno, contacto con interface sangre/aire, daño provocado por succión sanguínea, y exposición a restos de trombina, plasmina, ADP o complemento 2) Fármacos (e. g., heparina, protamina y Aspirina®) y producción de sustancias degradantes de la fibrina que se espera provoquen trastornos de la función plaquetaria	Agregación plaquetaria <i>ex vivo</i> anormal en respuesta a varios agonistas; ↓ aglutinación plaquetaria en respuesta a la ristocetina, y reacción liberadora deficiente debida a la deficiencia de gránulos alfa y densos
	Hipotermia		1) ↓ expresión de P-selectina soluble en plasma 2) ↓ niveles de tromboxano B ₂	↓ activación plaquetaria

Tomado de: Sharathkumar A. Tratamiento de la Hemofilia 2008, 19,14.

Tabla 2. Disfunción plaquetaria adquirida debido a fármacos y alimentos.	
Agente	Mecanismo potencial de acción
Abciximab, eptifibatide, inhibidores orales de la $\alpha 2\beta 3$, agentes fibrinolíticos	Inhibición de la interacción GPIIb/IIIa-fibrinógeno
Ticlopidina, clopidogrel	Inhibición de los receptores de ADP
Metilxantinas	Inhibición de la fosfodiesterasa
Aspirina y fármacos antiinflamatorios no esteroideos	Inhibición de la vía del tromboxano
Verapamil, bloqueadores de canales de calcio (nifedipina, diltiazem)	Inhibición de entrada de calcio
Antidepresivo tricíclicos, fluoxetina	Inhibición de la captación de serotonina
Estatinas	Interferencia con las vías de señalización de GTP
Antibióticos, β -lactámicos, nitrofurantoínas	Mecanismos desconocido
Alimentos y aditivos	Mecanismo potencial de acción
Ácidos grasos omega 3, aceite de pescado	Reducción en la síntesis de TXA ₂
Vitamina E, cebolla	Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico
Cebolla, comino, clavo	Disminución de la producción del tromboxano plaquetario
Ajo	Inhibición del fibrinógeno que se une a las plaquetas

Modificado de: Sharathkumar A. Tratamiento de la Hemofilia 2008, 19:15-16.

7.2.- Trastornos hereditarios de la función plaquetaria.

Aunque menos frecuente que los adquiridos, los trastornos de la función plaquetaria también pueden tener un origen congénito. Este grupo heterogéneo de enfermedades pueden cursar con hemorragia clínicamente significativa, particularmente ante situaciones de riesgo hemorrágico como partos, traumas, intervenciones dentales o cirugía. Se ha caracterizado un número de defectos genéticos que se asocian a alteraciones específicas de la función plaquetaria.¹

Defectos en los receptores plaquetarios.

Tromboastenia de Glanzman. La trombostenia de Glanzmann es un trastorno autosómico recesivo raro, que se caracteriza por la ausencia de la agregación plaquetaria inducida por agonistas. Esto es debido a anomalías tanto cualitativas como cuantitativas de la GPIIb/IIIa, receptor encargado de mediar la unión entre las plaquetas para asegurar la formación del tapón plaquetario en el sitio de la lesión. En los pacientes que padecen de esta alteración, cuando sufren alguna lesión en el endotelio, las plaquetas podrán adherirse al sitio dañado, sin embargo el reclutamiento de plaquetas adicionales al tapón hemostático será deficiente. La gravedad clínica en estos pacientes es variable: algunas pacientes presentan hemorragias leves, mientras que otros tienen hemorragias mucocutáneas (sangrado de las mucosas y la piel) frecuentes, graves y potencialmente fatales.²⁸

Síndrome de Bernard-Soulier. Este síndrome es un trastorno raro, se transmite en forma autosómica recesiva; se caracteriza por la presencia de plaquetas anormalmente grandes cuyo número también podría ser ligeramente menor al normal, los tiempos de hemorragia son marcadamente prolongados y

los estudios de agregación plaquetaria revelan que la agregación a la ristocetina es anormal. Estas características están presentes en la mayoría de los pacientes debido a una disminución o ausencia de las cuatro proteínas del complejo de glicoproteína de superficie identificado como el complejo GPIb/IX. Este complejo sirve como un sitio de unión para el FvW, que actúa como un puente entre las fibrillas de la matriz extracelular de colágeno expuestas en el sitio de la lesión y las plaquetas. La interacción entre el complejo GPIb/IX, FvW y colágeno es absolutamente necesaria para la adhesión plaquetaria y subsiguiente agregación en el sitio de la lesión. Las manifestaciones clínicas incluyen hemorragia mucocutánea, hemorragia gastrointestinal y sangrado de piel púrpura (sangrado en la piel que provoca manchas de color púrpura).

Defectos de Contenido granular/deficiencias de almacenamiento.

Los trastornos de almacenamiento son un grupo heterogéneo de enfermedades en las cuales existe una anomalía en la capacidad para almacenar los productos adecuados dentro de los gránulos plaquetarios. Los siguientes son algunos de los trastornos de almacenamiento reconocidos.²⁹

Síndrome de plaquetas grises. El síndrome de las plaquetas grises es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por una deficiencia proteínica (factor plaquetario 4, β -tromboglobulina, fibrinógeno ó PDGF) en el contenido de los gránulos α , tanto en plaquetas como en megacariocitos. Aunque se desconoce la base molecular concreta de esta enfermedad, parece que el trastorno se debe a un fallo en la maduración de los gránulos α durante la diferenciación de los megacariocitos. Como consecuencia, se produce una

salida continua de factores de crecimiento y citocinas a la médula, lo que origina mielofibrosis.²⁹

Deficiencias de gránulos densos. Puede ser un trastorno plaquetario hereditario o componente de enfermedades multisistémicas. Dentro de estas últimas, se encuentra el síndrome de Hermansky-Pudlak, el síndrome de Chediak-Higashi y el síndrome de Wiskott-Aldrich. Las deficiencias de gránulos densos se caracterizan por una diátesis hemorrágica moderada, con sangrado mucocutáneo, epistaxis, petequias, menorragia y sangrado posquirúrgico o posparto.³⁰

Defectos de liberación. Es probable que los pacientes con defectos de liberación representen el mayor grupo de personas con trastornos de la función plaquetaria. Pueden ocurrir debido a anormalidades en la transducción de señales de la membrana, vías metabólicas internas anormales y mecanismos o estructuras de liberación anormales que intervienen en las reacciones de liberación. Por lo tanto, los defectos de liberación constituyen un grupo heterogéneo de trastornos con una amplia variedad de defectos subyacentes cuyos mecanismos todavía no se han dilucidado por completo. La anormalidad común final de éste grupo de defectos es la incapacidad para liberar eficazmente el contenido de los gránulos después de la activación plaquetaria.³⁰

Defectos de factores de coagulación que afectan la función plaquetaria.

Las anormalidades de los factores de coagulación plasmáticos pueden generar defectos en la función plaquetaria, a pesar de cantidades normales de plaquetas que funcionan adecuadamente. La anormalidad más común en ésta

categoría es la enfermedad de von Willebrand (EvW) y la ausencia de fibrinógeno plasmático y/o plaquetario provoca un defecto en la función plaquetaria.

Enfermedad de von Willebrand. El FvW tiene la misión de mediar las interacciones entre las plaquetas y la pared del vaso sanguíneo a través de su receptor GPIb/IX, favoreciendo la adhesión y posterior agregación plaquetaria, además, estabiliza al factor VIII evitando su degradación prematura, cuya deficiencia provoca hemofilia A.

Se distinguen 2 tipos en cuanto a deficiencias cuantitativas: leve (EvW tipo 1), total (EvW tipo 3), y una por modificaciones cualitativas de la molécula del FvW (EvW tipo 2 con múltiples variantes). La variedad más frecuente, que afortunadamente es la menos severa, tiene una herencia de tipo dominante, por lo que si alguno de los padres la padece, el hijo también la presentará. Por el contrario la más grave tiene una herencia recesiva y su frecuencia es muy baja. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son las hemorragias de mucosas, siendo especialmente frecuentes las pérdidas ginecológicas, hemorragia nasal o de encías y la hemorragia urinaria o de origen digestivo.³¹

Afibrinogenemia. Este es un trastorno autosómico recesivo poco común en el cual existen niveles sumamente bajos o nulos de fibrinógeno, cabe recordar que el fibrinógeno es esencial para la formación del tapón hemostático ya que es el puente que une a las plaquetas entre sí, la ausencia de fibrinógeno plasmático provoca una interacción deficiente plaqueta-plaqueta.³⁰

8.- SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS (SICA).

Normalmente, la circulación arterial coronaria proporciona riego sanguíneo suficiente para satisfacer las demandas del miocardio. El desequilibrio entre el aporte y la demanda puede precipitar isquemia. Varios mecanismos patológicos pueden interferir con el flujo sanguíneo a través de las arterias coronarias e inducir la isquemia. La estrechez de una arteria coronaria principal en más del 50% altera el flujo sanguíneo en situaciones de mayor demanda de oxígeno. La alteración más frecuente en este sentido, es la aterosclerosis. La patogenia de la aterosclerosis incluye la lesión vascular y las respuestas subsecuentes a esta lesión. La lesión vascular puede dividirse en tres tipos:

Tipo I: Cuando existe alteración en la función de la célula endotelial. Puede ser causada por estrés mecánico (flujo turbulento) y por hipercolesterolemia.

Tipo II. Cuando se produce denudación endotelial y daño de la íntima. En esta lesión se produce agregación plaquetaria. Se liberan varios factores de crecimiento y vaso-activadores desencadenando un proceso que puede romper la cubierta delgada de una lesión aterosclerótica con un núcleo lipídico importante.

Tipo III. Además de lo establecido en la lesión tipo II se presenta daño a la media. Cuando se rompe una lesión lipídica se causa una lesión tipo III, con formación de trombos de gran tamaño que pueden ser oclusivos (generando un infarto) o no oclusivos (angina inestable).

La isquemia se manifiesta clínicamente por angina, infarto del miocardio o muerte cardíaca súbita (arritmias). Los síndromes coronarios agudos (SICA) son un grupo de padecimientos que agrupan a las distintas formas de presentación de la cardiopatía isquémica. Los trombos que ocluyen

completamente la luz arterial y con una pobre circulación colateral provocarán un infarto del miocardio. Cuando el trombo no ocluye completamente la luz arterial se presentara como angina inestable o infarto.³²

La clínica producida por los distintos SICA es muy similar y para diferenciarlos unos de otros se debe realizar de forma precoz un electrocardiograma que permitirá dividir a los pacientes afectados en dos grandes grupos. Además, dependiendo de la elevación o no de marcadores de necrosis miocárdica se establecerá un infarto propiamente dicho o angina inestable. A su vez los infartos pueden o no presentar onda Q de necrosis residual,³³ quedando por lo tanto la clasificación como sigue:



Cuadro 1. Clasificación de los Síndromes Coronario Agudos de acuerdo al electrocardiograma, elevación de marcadores de necrosis y a la presencia o ausencia de la onda Q de necrosis.

Estos síndromes se producen básicamente como consecuencia de la ruptura de la placa aterosclerótica (lesión tipo II y III). Las placas asociadas con lesiones propensas a la ruptura, son conocidas como “placas vulnerables”.

Las placas vulnerables están compuestas por un núcleo rico en lípidos en la porción central de una placa excéntrica. El núcleo contiene también numerosas células espumosas correspondientes a macrófagos cargados de lípidos, bajo una cubierta delgada que consiste en una capa fibrosa. La vulnerabilidad de la placa (o predisposición a la ruptura) se define de acuerdo al espesor real de la cubierta fibrosa, se considera “vulnerable” a toda lesión con una cubierta fibrosa menor de 65 μ de espesor. La morfología de la placa en pacientes con cuadro de angina estable o inestable es difícil de estudiar, debido a que la mayoría no muere por la enfermedad. Sin embargo algunos autores han informado que en pacientes con angina estable, fallecidos de procedimientos de re-vascularización, la aterosclerosis grave afectaba dos vasos o más, incluyendo la coronaria izquierda principal en alrededor de 30% de los casos. La trombosis no es un hallazgo frecuente en estos casos.

La frecuencia de trombosis coronaria en pacientes con infarto agudo del miocardio (IAM) supera el 80% y la de trombosis inidentificadas por angiografía es del 90%. La ruptura de la placa constituye el factor más importante en el desarrollo de trombosis coronaria en el infarto agudo del miocardio. Los autores informan que al menos el 21% de las muertes súbitas por causas coronarias tienen evidencias de IAM y que el 90% de estas tienen lesiones coronarias con trombos oclusivos. Alrededor del 70% de los trombos se asocian con ruptura y el 30% con erosión de la placa.^{34, 35, 36}

9.- PARTICIPACIÓN DE LAS PLAQUETAS EN LOS SICA.

9.1.- Trombosis e inflamación.

La trombosis intracoronaria es el evento más relevante en el inicio de un síndrome coronario agudo; evento inicial que prosigue a la ruptura de la placa en una arteria coronaria.

El núcleo lipídico de una placa está compuesto de colesterol LDL oxidado y de macrófagos y está separado del lumen vascular por una capa fibrosa. La combinación de la digestión enzimática y de las fuerzas mecánicas externas en la arteria conllevan a la ruptura de la capa fibrosa y exposición del material ateromatoso altamente pro-coagulable hacia el torrente sanguíneo. El depósito y la infiltración de macrófagos provocan una liberación enzimática que lleva a la digestión de elastina y colágeno de la capa fibrosa. El desgarre por estrés y las fuerzas mecánicas de la sístole actúan en los sitios inestables de la placa provocando mayor ruptura; contribuyendo a este proceso otros factores como la hipertensión, tabaquismo, liberación de catecolaminas y espasmo coronario. El segundo evento es la formación del trombo donde se presentan 4 estadios:

- 1) Adhesividad plaquetaria.
- 2) Activación de los factores de coagulación.
- 3) Propagación del trombo.
- 4) Organización del trombo

1) Adhesividad plaquetaria. Es el paso inicial en la trombosis arterial, ocurre cuando las plaquetas se adhieren al sitio de la lesión vascular. El endotelio normalmente presenta una superficie lisa que no permite la adherencia de los elementos celulares de la circulación. La ruptura de la placa o el daño al endotelio expone varias proteínas de la pared endotelial que se unen a

receptores específicos de las plaquetas provocando su adherencia, el receptor plaquetario principal denominado glicoproteína Ib/IX, que se une al factor de von Willebrand en la pared arterial, este último, sufre cambios en su superficie, con lo cual promueve la adhesión de las plaquetas, que se extienden para cubrir la mayor parte de la lesión liberando su contenido granular, con lo que contribuyen al inicio del proceso de la trombosis.

2) Activación de los factores de coagulación. Las vías de la coagulación, intrínseca y extrínseca convergen en un punto común: la activación del factor X y de la protrombina. La lesión arterial expone Factor Tisular (FT), que estimula la actividad enzimática del factor VII para la activación de los factores IX y X. Al activar el factor X se generan pequeñas cantidades de trombina que activa a los cofactores V y VIII, con lo que se genera mayor cantidad de trombina, este a su vez es un agonista plaquetario muy potente que recluta más plaquetas al trombo.

3) Propagación del trombo. Se realiza cuando más plaquetas se incorporan a la masa creciente del trombo. Lo que se logra a través de la agregación plaquetaria.

4) Organización del trombo. El desarrollo de un trombo es el producto del balance entre dos fuerzas opuestas, una que promueve la propagación de éste y las fuerzas opuestas que lo rodean y disminuyen su tamaño. El resultado final dependerá de la magnitud de cada una de estas fuerzas ya sea provocando la oclusión total de la arteria, un trombo mural o la disolución del coágulo.³⁷

10.- TRATAMIENTOS ANTIAGREGANTES.

Las plaquetas han asumido un papel preponderante en la medicina cardiovascular gracias a la comprensión del síndrome coronario agudo como un proceso aterotrombótico. Gracias a la información con la que se cuenta actualmente, en cuanto a estructura y función de las plaquetas se refiere, se han desarrollado una serie de fármacos que buscan tratar y prevenir la recurrencia de los SICA, éste grupo de fármacos ha sido denominado antiagregantes plaquetarios³⁸.

10.1.-Tienopiridinas.

Las plaquetas presentan en su superficie tres receptores para el ADP, cada uno induce distintas vías de señalización plaquetaria y distintas funciones en la agregación plaquetaria, dentro de este grupo de receptores se encuentran el P2Y₁ y el P2Y₁₂.³⁹

Los primeros inhibidores del receptor de ADP (P2Y₁₂) desarrollados, fueron las tienopiridinas. En los Estados Unidos, la segunda generación de tienopiridinas (clopidogrel) fue preferida sobre la primera generación (ticlopidina) debido a su menor incidencia de discrasia sanguínea y menor toxicidad de la médula ósea. En el 2009 una tercera generación de tienopiridinas (prasugrel) fue aprobada para su uso en Estados Unidos y Europa.⁴⁰

Ticlopidina. Fue el primer agente antiplaquetario de la familia de las tienopiridinas que se usó. Es un profármaco que requiere pasar por el hígado en dos ocasiones para obtener el metabolito activo, inhibe de manera irreversible al receptor de ADP P2Y₁₂.⁴⁰

Clopidogrel. La mayoría del clopidogrel que se absorbe por el organismo una vez que es ingerido (85-90%) se hidroliza a un ácido carboxílico por acción de una carboxilasa convirtiéndolo en un ácido carboxílico (metabolito inactivo), el resto del fármaco 10-15% se metaboliza rápidamente por isoenzimas del citocromo P450 en dos pasos. En el primer paso el anillo de tiofeno del clopidogrel se oxida formando el 2-oxo clopidogrel, que a su vez se hidroliza a un metabolito activo altamente lábil, este nuevo metabolito tiene en su estructura tanto un ácido carboxílico como un grupo tiol lo que provoca que el metabolito sea altamente inestable. Estudios recientes indican que las isoenzimas CYP2C19, CYP1A2 y CYP2B6 participan en el primer paso metabólico, mientras que las CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6 y CYP3A son responsables del segundo paso. Una vez que el metabolito activo altamente inestable, R130964 se ha formado, se une covalentemente al receptor plaquetario P2Y₁₂ específica e irreversiblemente durante el paso a través de la circulación hepática, inhibiendo de esta forma la activación-agregación plaquetaria inducida por ADP durante toda la vida media de la plaqueta.⁴¹

Prasugrel. Es una tienopiridina de tercera generación que al igual de las demás tienopiridinas requiere la metabolización hepática para convertirse en un fármaco activo que inhiba de manera irreversible el receptor plaquetario P2Y₁₂. A diferencia de las dos anteriores tienopiridinas, el prasugrel solo requiere pasar por el hígado (CYP450) una ocasión para generar el metabolito activo. En comparación con dosis estándar de clopidogrel, el metabolismo de una dosis estándar de prasugrel es más eficiente y por ello produce una inhibición

más pronunciada con dosis inferiores. En la **figura 4**, se esquematizan los pasos metabólicos del clopidogrel y del prasugrel.

El prasugrel ha demostrado ser un inhibidor plaquetario muy potente, sin embargo también ha demostrado un aumento en el riesgo hemorrágico. Basado en este riesgo, el prasugrel está contraindicado en pacientes con historia de ataque isquémico transitorio o fulminante y generalmente no es recomendado a pacientes de 75 años o más y que pesan menos de 60kg.⁴²

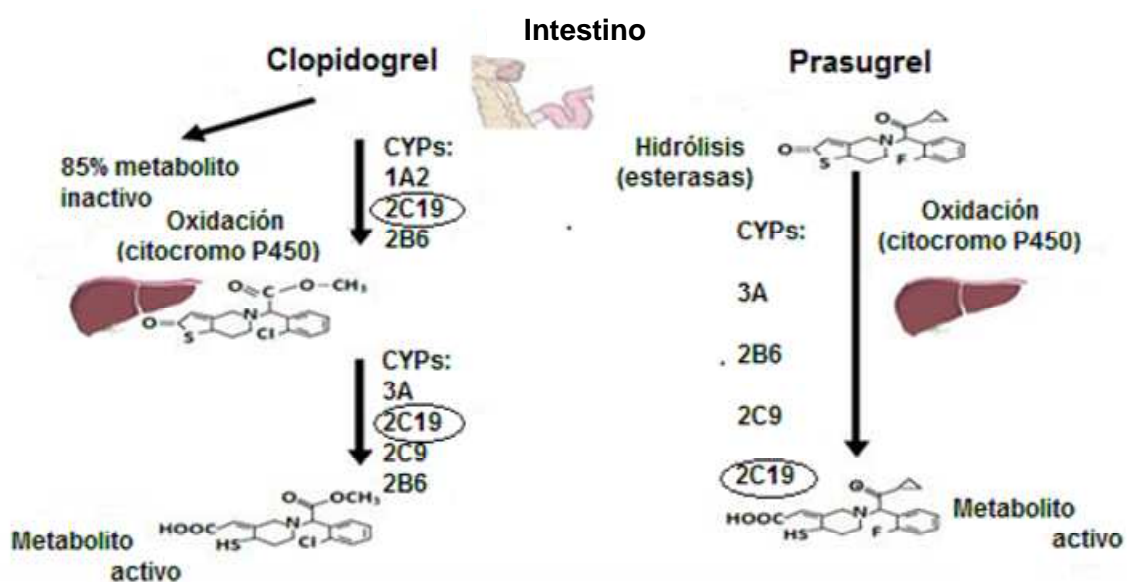


Figura 4. Metabolismo del clopidogrel y prasugrel. Modificado de <http://www.medscape.org/viewarticle/739071>.

10.2.- Inhibidores de ciclooxigenasa.

Dentro de éste grupo de fármacos se encuentran tanto el ácido acetilsalicílico como el trifusal.

Aspirina. La Aspirina y otros agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) disminuyen la función plaquetaria inhibiendo la formación de tromboxano A₂, un potente activador plaquetario. El grado de inhibición plaquetaria de cada

AINE depende del grado de actividad de las enzimas COX-1 ó COX-2, su vida media y de si su efecto es reversible o no. Aunque varios AINES poseen actividad antiagregante, generalmente sólo se habla de la aspirina, que es frecuentemente prescrita en la prevención de eventos cardiovasculares

La aspirina inhibe de manera irreversible la COX-1, por acetilación de un residuo de serina, de esta forma evita que el ácido araquidónico se una al sitio activo de la enzima, impidiendo la formación de TXA2 e indirectamente la amplificación del proceso de activación de otras plaquetas. En las plaquetas, bajas dosis de aspirina son efectivas debido a que las plaquetas no tienen núcleo, es decir son incapaces de llevar a cabo la síntesis proteica, por lo tanto tienen una capacidad mínima de sintetizar nueva enzima COX-1, esto implica que para revertir el efecto, nuevas plaquetas deben ser sintetizadas y liberadas de la médula ósea.

Existe evidencia clínica que indica que la aspirina ayuda a prevenir eventos trombóticos, sin embargo este beneficio se acompaña de riesgo hemorrágico. En general, pequeñas dosis de aspirina (75 o 100mg diarios) son consideradas igual de efectivas que dosis altas (300 o 325mg diarios), pero con un riesgo de sangrado mucho menor.

Existen diversos estudios que hablan sobre la variabilidad en la respuesta a la aspirina y a todos los demás antiagregantes, en ellos puede observarse que existen pacientes que muestran una inhibición plaquetaria excesiva, lo que quizás se acompañe con un mayor riesgo hemorrágico, en el otro extremo, hay pacientes que presentan un grado de inhibición bastante reducido y por lo tanto quizás tienen mayor probabilidad de sufrir un nuevo evento trombótico. Actualmente no existe una explicación clara de por qué se presenta este rango

de respuestas, sin embargo, se sabe que el cumplimiento del tratamiento, la biodisponibilidad del medicamento, la interacción entre fármacos y la velocidad de renovación de las plaquetas juegan un papel importante en la respuesta a estos fármacos⁴⁰.

Triflusal. El trifluorosalicílico inhibe de forma irreversible a la COX-1 plaquetaria sin apenas efectos en la COX-2, por lo cual se preserva la síntesis de PGI₂. Además de inhibir la síntesis del tromboxano, inhibe la acción de las fosfodiesterasas. A pesar de que hay mucho menos ensayos clínicos que evalúen su eficiencia, se han demostrado beneficios clínicos similares a los de la aspirina en pacientes después de IAM o eventos cerebrovasculares isquémicos durante la fase aguda.³⁸

10.3.-Otros.

Inhibidores de la Glicoproteína IIb/IIIa. A diferencia de los agentes antiplaquetarios que inhiben una vía de activación, los antagonistas del receptor GPIIb/IIIa bloquean el final de la vía común de la agregación plaquetaria. El cambio en la conformación de este receptor (debido a la activación de las plaquetas) conlleva a una mayor afinidad al fibrinógeno soluble mediante la secuencia tripeptídica RGD. Una vez que el fibrinógeno se une al receptor activado GPIIb/IIIa –también conocido como receptor α IIb β 3- se convierte a fibrina en el paso final de la cascada de la coagulación, permitiendo la unión de plaquetas (agregación) y la formación del tapón plaquetario. Debido a esto, los antagonistas del receptor GPIIb/IIIa son considerados potentes agentes antiplaquetarios. Estos medicamentos aprovechan la secuencia específica de aminoácidos en el fibrinógeno y otros ligandos (como el factor de

von Willebrand, fibronectina y vitronectina) para prevenir la agregación plaquetaria.

Hay tres antagonistas del receptor GPIIb/IIIa disponibles, abciximab, eptifibatide y tirofiban. Estos agentes son administrados vía intravenosa, su efecto comienza minutos después de su administración, todos han demostrado ser muy efectivos en la prevención de muerte por infarto al miocardio y en la revascularización urgente en pacientes con intervención coronaria percutánea, sin embargo el riesgo de sangrado es alto.⁴³

Fosfodiesterasas inhibitorias. En las plaquetas, la adenilato ciclasa y la guanilato ciclasa, elevan la concentración de los nucleótidos de monofosfato cíclicos (adenosin monofosfato cíclico y guanosin monofosfato cíclico), los cuales tiene un efecto inhibitorio dentro de las plaquetas. Los inhibidores de la fosfodiesterasa cilostazol y dipiramida, ayudan a este efecto inhibitorio evitando la degradación de los nucleótidos de monofosfato cíclicos.

El eptifibatide y el tirofiban son antagonistas del receptor GPIIb/IIIa reversibles y de acción corta. El eptifibatide es un heptapéptido cíclico que incluye la secuencia de tres aminoácidos, con alta especificidad por el receptor de GPIIb/IIIa, mientras que el tirofiban es un derivado no peptídico que imita la secuencia RGD.

Ambos poseen una corta vida media (2h) y, debido a la reversibilidad de su efecto sus propiedades antitrombóticas se disipan rápidamente tras la suspensión del tratamiento.⁴⁴

11.- METODOLOGÍAS PARA EVALUAR LA FUNCIÓN PLAQUETARIA.

11.1.-Agregometría Plaquetaria.

La medición de la agregación de las plaquetas o agregometría plaquetaria fue descrita en 1962 por Born como una técnica para estimar la cinética de la agregación de las plaquetas por medio de turbidimetría (medición de la turbidez o densidad óptica). El método se convirtió de manera rápida en el patrón de referencia para el estudio de la función plaquetaria.

En la actualidad existen dos métodos diferentes para el estudio de la agregación plaquetaria: el método óptico original con plasma rico en plaquetas y el método de impedancia con sangre total.

Agregación de plasma rico en plaquetas (PRP) por método óptico. Este estudio mide en tiempo real la agregación de las plaquetas en una muestra de PRP mediante aclaramiento óptico. Esta prueba requiere un agregómetro (espectrofotómetro), en el que se deposita la muestra de PRP en un recipiente o cubeta con incubación a 37°C, que se encuentra entre una fuente de luz y una foto celda de medición la cual calcula la densidad óptica o turbidez del PRP. La preparación del PRP requiere la separación de una fracción de plaquetas del resto de las células (eritrocitos y leucocitos) de una muestra de sangre completa, mediante una centrifugación lenta. También se requiere la preparación de una muestra de plasma pobre en plaquetas (PPP) que se obtiene centrifugando el remanente de la primera centrifugación a una velocidad y tiempo mayores. Ya en el PRP ajustado o no a una cantidad determinada de plaquetas, se adicionan una o varias sustancias conocidas por su efecto agonista sobre las plaquetas, por ejemplo ADP, Epinefrina, ácido

araquidónico o colágena, con la finalidad de inducir agregación de las plaquetas y simular *in vitro* lo que sucede *in vivo*. Mientras se realiza este proceso la luz pasa a través de la cubeta del PRP y la transmisión de la luz a través de una foto celda se detecta y grafica en tiempo real el porcentaje del aclaramiento de la muestra; a mayor agregación plaquetaria, mayor transmisión de la luz y viceversa.

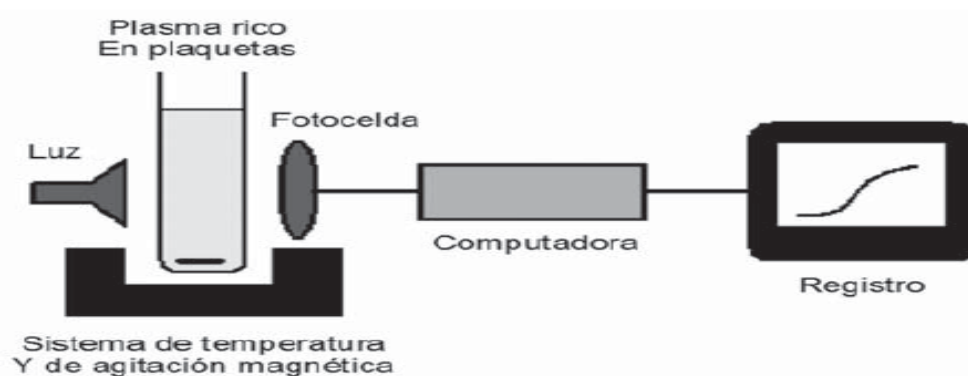


Figura 5. El agregómetro está formado por una fuente que incide un haz de luz que pasa a través de una celda que contiene al PRP, la cantidad de luz que pasa a través de esta celda se capta por una fotocelda que envía la señal a un software que trasforma la señal de luz en una señal gráfica, que puede visualizarse y del cual se obtienen datos numéricos de la capacidad de agregación de las plaquetas en el PRP. Tomado de: Vargas A. Hemostasia y Trombosis 2010,3:2.

Dependiendo del agonista que se utilice es posible distinguir en el gráfico cinco fases con dos curvas.

- 1.- La primera fase se debe al incremento inicial de la transmisión de luz atribuible a la dilución del PRP por el agonista que se añade.
- 2.-Discreta disminución de luz debido al cambio de forma de las plaquetas.
- 3.-Incremento agudo inicial de la transmisión de luz conforme las plaquetas se agregan unas con otras (agregación primaria).

4.-Meseta breve o disminución de la agregación debido a que la agregación primaria es reversible. En esta fase comienza la secreción de gránulos.

5.-Agregación secundaria que se estimula por la secreción de los gránulos plaquetarios (agregación secundaria).

En la mayoría de las personas esta respuesta bifásica se observa con concentraciones bajas de ADP y epinefrina. Las curvas que se generan con otros agonistas como la colágena, trombina o ADP en altas concentraciones, son típicamente unimodales, es decir sólo se observa una sola curva, debido a que la agregación primaria no es visible.



Figura 6. Gráfica obtenida mediante agregometría plaquetaria por el método óptico. En la gráfica se muestran los 5 trazos característicos que se forman al emplear un agonista débil (como la epinefrina o el ADP), también se observa la agregación primaria (representada por la primera onda) y la agregación secundaria (representada por la segunda onda). Cuando se emplea un agonista fuerte la primera onda no se distingue de la segunda. Tomado de: Vargas A. Hemostasia y Trombosis 2010,3:2.

Éste método tiene varias limitaciones, consume tiempo, es laborioso y complejo, por lo que se requiere personal altamente capacitado. La

interpretación de los resultados también requiere experiencia y conocimiento de la técnica y fisiopatología de la hemostasia. La muestra debe obtenerse por punción venosa directa y colectarse en tubos con aticoagulante a base de citrato. La prueba debe realizarse a más tardar a las dos horas después de obtener la muestra. La prueba no debe realizarse en muestras hemolizadas, lipémicas o con contaminación por eritrocitos.⁴⁵

Agregometría en sangre entera. Por Método de impedancia.

En 1980 Cardinal y Flower desarrollaron un método por el que la agregación plaquetaria se puede medir en sangre entera mediante impedancia eléctrica, en donde se coloca una muestra de sangre en una cubeta o recipiente a 37°C, se colocan dos electrodos de platino a distancia fija y entre los electrodos se aplica una corriente eléctrica. La adición de un agonista (ADP, epinefrina, colágena o ristocetina) estimula la agregación de las plaquetas en la superficie de los electrodos, lo que impide el flujo de la corriente eléctrica. El aumento en la resistencia al flujo de la electricidad es proporcional a la agregación de las plaquetas en torno a los electrodos y se genera una curva de agregación. Este método elimina algunas de las variables confusas en la preparación del PRP ya que no se requiere de centrifugación, además, es más simple y fácil de realizar, sin embargo su uso es limitado y poco estandarizado.

Al igual que la agregometría convencional, la agregación por impedancia en sangre completa es relativamente insensible a la presencia de agregados de plaquetas. Este examen también requiere de técnicos expertos y es significativamente más costoso.⁴⁶

11.2.- *Point of care*: Pruebas que se realizan al pie de la cama del paciente.

Nuevas opciones para evaluar la función plaquetaria han sido recientemente desarrolladas. La necesidad surgió debido a las desventajas de la prueba de tiempo de hemorragia y de la agregometría plaquetaria como pruebas para evaluar la función de las plaquetas; además, los resultados de medición de tromboxano A₂ sérico y 11-dihidrotromboxano B₂ urinario (mediciones específicas del efecto de la aspirina sobre la ciclooxigenasa) no pueden obtenerse rápidamente. Varias de estas nuevas pruebas, son llamadas ***point-of-care***, debido a que pueden realizarse al pie de la cama del paciente sin la necesidad de tener un alto grado de experiencia técnica.

VerifyNow. Conocido formalmente como el analizador rápido de la función plaquetaria Ultegra, el VerifyNow es un *test* del tipo *point-of-care* aprobado por la FDA para medir los defectos en la función plaquetaria inducidos por la aspirina, las tienopiridinas o antagonistas de la GPIIb/IIIa. El VerifyNow usa el mismo principio y por lo tanto tiene las mismas ventajas que la agregometría plaquetaria.

El equipo cuenta con una cámara de muestra, que contiene un agonista plaquetario (péptido activador del receptor de trombina, ácido araquidónico o difosfato de adenosina ADP), perlas recubiertas con fibrinógeno y un haz de luz que pasa a través de la cámara de muestra que se mide durante el desarrollo de la prueba.

Después de colectar la muestra en un tubo con citrato de sodio, ésta se deposita en la cámara de muestra, comenzando la activación de las plaquetas.

Una vez que el receptor GPIIb/IIIa es activado por acción del agonista las plaquetas se unen al fibrinógeno de las perlas, que a su vez se une a otra plaqueta con el receptor GPIIb/IIIa activado provocando la aglutinación de las plaquetas y las perlas. Esta aglutinación provoca que la intensidad de luz aumente y por lo tanto la señal medida. Fármacos que inhiben al receptor GPIIb/IIIa o que evitan su expresión por la inhibición del ácido araquidónico o por inhibición de la activación plaquetaria inducida por ADP, disminuyen la agregación de las plaquetas, provocando que la cantidad de luz que pasa a través de la cámara sea menor.

Las tres pruebas actualmente disponibles para el VerifyNow son: Prueba VerifyNow IIb/IIIa (sensible a antagonistas de la GPIIa/IIIb), prueba para la Aspirina VerifyNow (sensible a la aspirina) y prueba VerifyNow P2Y₁₂ (sensible a las tienopiridinas).

En la prueba para la aspirina, el ácido araquidónico se usa como agonista. La prueba es específica para la aspirina, porque el ácido araquidónico requiere, para inducir la agregación plaquetaria, la actividad de la COX-1, que se bloquea específicamente por la aspirina. En la prueba VerifyNow P2Y₁₂, el ADP se usa como agonista. El ADP estimula la agregación plaquetaria mediante la activación de dos receptores P2Y₁ y P2Y₁₂. Aunque el agonista usado en la prueba VerifyNow P2Y₁₂ es el ADP en una concentración de 20µmol/L un segundo agente, Prostaglandinas E1, es adicionado para evitar la salida de calcio intracelular y con ello reducir la activación plaquetaria originada por la unión del ADP al receptor P2Y₁.⁴⁷

Plateletworks. El plateletworks es otra prueba del tipo *point-of care*, que utiliza sangre entera, requiere una preparación mínima de la muestra que está basado en la agregación plaquetaria. El *kit* de agregación del Plateletworks y el contador de sangre Ichor comparan las plaquetas contadas en un tubo control con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) con las contadas en un tubo con Citrato después de la agregación inducida por ADP o colágena. La agregación plaquetaria es medida como la disminución de plaquetas “individuales”. Los resultados de la prueba correlacionan muy bien con el estándar de oro, la agregometría plaquetaria y puede ser usada para monitorear la terapia antiplaquetaria, sin embargo la prueba no ha sido bien estudiada para este propósito y no ha sido reportada para predecir resultado clínicos.⁴⁸

Tromboelastograma. Sistema de mapeo plaquetario. Se inventó hace 50 años, pero ha sido recientemente modernizado como un sistema de mapeo plaquetario. Esta prueba se realiza *in vitro*, empleando una cubeta o copa donde se deposita la muestra sanguínea, que se incuba durante algunos minutos. La sangre depositada en la copa, se encuentra en contacto con un pin, que se halla suspendido libremente dentro de la muestra y que, a su vez, está conectado por su extremo distal a una guía o cable de torsión que lo hace girar; a medida que la sangre se coagula, modifica la resistencia del pin; estas variaciones obtenidas por las características del coágulo y de su etapa evolutiva, son registradas por un transductor electromecánico, el cual convierte la rotación del pin en una señal eléctrica. Es posible adicionarle a la muestra un agonista (como ADP o ácido araquidónico) y documentar mediante este método las distintas etapas de la coagulación, es decir, la formación de la

fibrina, la retracción del coágulo, la agregación plaquetaria y la lisis del coágulo. No obstante deben realizarse estudios que determinen si este sistema puede usarse para monitorear la terapia antiplaquetaria.⁴⁹

Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP). Al igual que en la prueba P2Y₁₂ del VerifyNow, la combinación de ADP y prostaglandinas E1 es usada en la citometría de flujo basada en la prueba VASP. Bajo estas condiciones, la fosforilación de VASP (identificada por un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la forma fosforilada de VASP) es directamente proporcional al grado de inhibición del receptor P2Y₁₂. La comparación de la prueba de VASP con la agregometría plaquetaria inducida con ADP (por el método óptico) demuestra que el nivel de inhibición inducido por tienopiridinas es mayor en la prueba VASP, probablemente porque la agregación plaquetaria todavía puede ocurrir por la estimulación del receptor P2Y₁ en presencia de tienopiridinas. Las ventajas de esta prueba son: ocupa un volumen pequeño de muestra y se requiere sangre entera para su realización. Las desventajas son: se requiere un citómetro de flujo, la muestra requiere una preparación previa antes de procesarla y se requiere de personal con experiencia.⁵⁰

PFA-100. Antecedentes EPI/COL ADP/COL.

El sistema PFA-100 fue creado en un principio con la intención de evaluar de manera rápida la función plaquetaria en muestras de sangre total citratada. En un inicio solo se fabricaron dos tipos de cartuchos de prueba, uno de ellos contiene una membrana recubierta principalmente de colágena y epinefrina

(COLI/Epi); mientras que en el segundo la membrana está recubierta con colágena y ADP (COLI/ADP). Aunque la composición de los cartuchos es diferente el principio del método es el mismo

El PFA-100 es un equipo que simula *in vitro* el proceso de adhesión y agregación de las plaquetas después de una lesión vascular. Consta de cartuchos de prueba de un solo uso, los cuales contienen una serie de piezas, entre las que se incluyen: un capilar, un depósito para muestras y una membrana con actividad bioquímica que presenta un orificio central circular.

La muestra citratada a evaluar se coloca en el cartucho, en el depósito de muestra, donde será aspirada a través del capilar hasta llegar al orificio central de la membrana; esta membrana recubierta con colágena forma la matriz inicial para la adhesión de las plaquetas, sirviendo como disparador del primer estímulo fisiológico para la activación plaquetaria. Una vez que las plaquetas se han adherido a la colágena, se han activado y han entrado en contacto con el segundo agonista fisiológico (epinefrina o ADP) liberan el contenido de sus gránulos, lo que les permite adherirse a plaquetas vecinas formando finalmente agregados plaquetarios. Los agregados de plaquetas forman un tapón en el orificio de la membrana. El PFA-100 determina el tiempo que transcurre desde el inicio de la prueba hasta que la membrana es ocluida completamente. Este tiempo se conoce como tiempo de oclusión (TO); a mayor TO, mayor inhibición de la función plaquetaria, a menor TO, menor inhibición.⁵¹



Figura 7. Composición del sistema PFA-100. Modificado de <http://blog.naver.com/hyouncho2?Redirect=Log&logNo=60104777295&from=section>

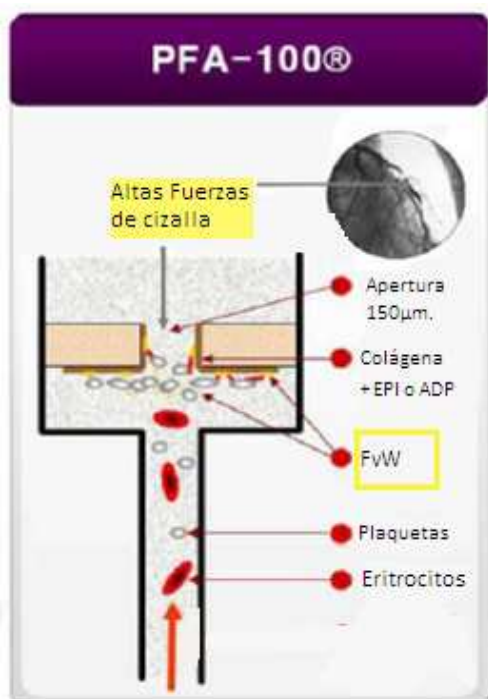


Figura 8. El cartucho de prueba del PFA-100, posee un orificio en una membrana que simula una lesión endotelial, cuando la muestra se coloca en el depósito, el equipo la succiona y la hace pasar a través de la membrana, el equipo registra el tiempo que se tarda en ocluir el orificio en la membrana.

Modificado de: <http://blog.naver.com/PostView.nhn?blogId=hyouncho2&logNo=60104777295>

Cartucho Innovance P2Y. En un principio, los cartuchos del PFA-100 mencionados, no fueron diseñados para el estudio del efecto de los diversos antiagregantes como la aspirina, el clopidogrel o el prasugrel (piedra angular en el tratamiento de los Síndrome Coronarios Agudos), sino para detectar trastornos de la función plaquetaria, por lo que ante el advenimiento de los antiagregantes y la posibilidad de variación en la respuesta a los mismos, comenzaron a hacerse diversos estudios para determinar si el PFA-100 era capaz de monitorizar este efecto antiagregante.⁵² Los estudios mostraron que el cartucho de COL/Epi es capaz de detectar los efectos antiagregantes provocados por la ingesta de aspirina. A la par, se realizaron estudios para evaluar si el cartucho Col/ADP permitía detectar la actividad antiagregante de fármacos que bloquean al receptor de ADP. Estos estudios usaron la agregometría plaquetaria por transmisión de luz, y la agregometría en sangre entera para comparar los resultados obtenidos con el PFA-100 usando el cartucho de COL/ADP. En estos primeros estudios los pacientes evaluados fueron personas sanas que tomaron clopidogrel. Las muestras sanguíneas evaluadas fueron recolectadas en dos momentos, la primera se realizó antes de la ingesta del medicamento para obtener una lectura basal, la segunda se tomó 10 días después. Durante esos días los pacientes siguieron un régimen de dosificación que consistió en tomar 75 mg de clopidogrel diarios. Tanto las agregometría como la prueba del PFA-100 fueron realizadas el mismo día. Los resultados obtenidos en el PFA-100 mostraron sólo un pequeño alargamiento del tiempo de oclusión respecto a los valores de referencia, lo que sugería que el cartucho COL/ADP probablemente era insensible a la acción del clopidogrel.⁵³

Estudios posteriores compararon resultados entre el Multiplatelet Analyzer y al cartucho de COL/ADP, para evaluar el efecto de la terapia combinada de aspirina y clopidogrel en pacientes con enfermedad cardiovascular. Con este estudio los investigadores confirmaron que el cartucho COL/ADP era insensible a los efectos del clopidogrel ya que los tiempos de oclusión fueron ligeramente más largos que los reportados en el intervalo de referencia. Por ello Siemens, compañía creadora del sistema PFA-100, emitió un comunicado en el que indicaba que el rendimiento de otros antiagregantes que no fueran la aspirina empelando este sistema no habían sido establecidos y por lo tanto el cartucho del PFA-100 COL/ DP no era adecuado para evaluar los efectos de las tienopiridinas, como el clopidogrel.⁵⁴

De esta forma se diseñó el cartucho **Innovance P2Y**, un cartucho que en teoría permite detectar los efectos de todos aquellos fármacos que bloquean al receptor de ADP específicamente al receptor P2Y₁₂ como el clopidogrel. El cartucho funciona de manera similar al cartucho de COL/ADP, sin embargo tiene varias diferencias. La membrana del nuevo cartucho está recubierta con 20 µg de ADP, que es el agonista fisiológico que activa a las plaquetas a través de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂, pero no contiene colágena para evitar que las plaquetas se adhieran y agreguen por activación de otros receptores no dependientes de ADP. La membrana también contiene 5µg de prostaglandina E₁ para medir específicamente la agregación producida por la activación del receptor P2Y₁₂ e inhibir la acción que pudiera generarse tras la activación del receptor P2Y₁. Adicionalmente, la membrana también cuenta con clorhidrato de calcio dihidratado.⁵⁵

II.- JUSTIFICACIÓN.

La prueba de agregometría plaquetaria, considerada como “*gold standar*” para la evaluación de la función plaquetaria, requiere de equipo sofisticado, gran cantidad de muestra de sangre venosa, personal altamente entrenado, condiciones de tiempo específicas para su realización; es decir, es una prueba de difícil realización e implementación. Existen condiciones que pueden hacer necesaria la evaluación de la función plaquetaria en algunos pacientes de manera rápida y adecuada. Una prueba que se realice al pie de la cama puede ser una alternativa eficaz en el estudio de la función plaquetaria para toma de decisiones en el manejo antiagregante de los pacientes que requieren este tratamiento.

El PFA-100 es un equipo diseñado para la evaluación de la función plaquetaria, originalmente contaba con dos cartuchos que le permitían evaluar a las plaquetas en términos del efecto de la aspirina y la presencia de algunas enfermedades congénitas como la enfermedad de von Willebrand o de Glanzman.

En el 2010, se dio a conocer en Europa un nuevo cartucho que podría ayudar en la evaluación del efecto de antagonistas del receptor P_2Y_{12} . En México, hasta junio del 2012 no se había dado entrada al nuevo cartucho *Innovance P2Y*, se solicitó al Laboratorio de Trombosis, Fibrinólisis y Función Plaquetaria, que dada la experiencia en la evaluación del efecto de antiagregantes, se realizara la valoración del nuevo cartucho.

III.- OBJETIVO.

Determinar la eficiencia del nuevo cartucho *Innovance P2Y*, comparado con la agregometría plaquetaria en plasma rico en plaquetas por el método óptico, así como la aplicación de los cartuchos COL/EPI y COL/ADP en el monitoreo del tratamiento antiagregante de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología y la identificación de pacientes con actividad plaquetaria residual elevada.

Determinar si el PFA-100 puede ayudar a una evaluación rápida del efecto del antiagregante por inhibidores del P_2Y_{12} .

III.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Las muestras que se estudiaron provenían de pacientes sobrevivientes de infarto, mayores de 18 años del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Se incluyeron tanto pacientes hospitalizados como pacientes de consulta externa. Todos los pacientes tomaban algún antiagregante ya sea aspirina 75 o 100mg/d, clopidogrel 75 o 100mg/d, clopidogrel + aspirina 75/100mg/d, prasugrel de 10mg/d, prasugrel + aspirina o ticagrelor + aspirina. Tanto la agregometría plaquetaria como la prueba en el PFA-100 se realizaron el mismo día de la toma de muestra en las siguientes dos horas.

Debido a que tanto la agregometría plaquetaria como el PFA-100 son pruebas que miden la función plaquetaria, se requirió incluir en el estudio un grupo control de sujetos sanos en los que la función plaquetaria fuese adecuada, por ello se obtuvo muestra sanguínea de 34 donares sanos de plaquetas provenientes del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Este grupo fue denominado grupo de controles de población normal (CPN).

Por cada día en el que se realizaron pruebas a algún paciente o CPN se solicitaron al banco de sangre 6 muestras de donadores sanos. Las muestras se mezclaron y trabajaron como *pool*, este control sirvió para verificar el funcionamiento del agregómetro, PFA-100, reactivos y cartuchos.

Además de la agregometría plaquetaria y las pruebas en el PFA-100, se midieron número de plaquetas y volumen plaquetar medio en el plasma rico en plaquetas obtenido para la realización de la agregometría plaquetaria.

Se descartaron todas aquellas muestras trombocitopénicas con una cuenta plaquetaria menor a 150 000 plaquetas/ μ L por no contar con la cantidad mínima necesaria de plaquetas para obtener lecturas confiables del PRP.

También se descartaron aquellas muestras lipémicas o ictéricas ya que no permiten el paso de luz.

Recolección de muestras. Muestras de pacientes: A todos los pacientes con tratamiento antiagregante se les tomó una muestra sanguínea por punción venosa en condiciones de ayuno. Por cada paciente se recolectaron 4 tubos para tiempos de coagulación de 4.5mL (vacutainer con citrato de sodio al 3.2%), 3 de ellos se usaron en la agregometría plaquetaria; el tubo restante en el PFA-100.

Muestras CPN's: Las muestras sanguíneas de este grupo control se obtuvieron bajo las mismas condiciones que las muestras de los pacientes por el personal de enfermería del banco de sangre del Instituto. Por cada sujeto sano se colectaron 6 tubos para tiempos de coagulación de 4.5mL (vacutainer con citrato de sodio al 3.2%), 4 de ellos fueron usados para la prueba agregometría plaquetaria, 1 en el PFA-100 y el tubo restante fue usado para las pruebas de coagulación, dosificación de fVIII:c y factor de von Willebrand.

Mezcla de donadores sanos: Se solicitan 6 muestras de donadores (1 tubo por cada donador). Las muestras se colectaron en tubos para tiempos de coagulación de 4.5mL (vacutainer con citrato de sodio al 3.2%) por el personal de enfermería del banco de sangre. A cada tubo se le extrajeron 500µL de sangre citratada y se mezclaron, este primer *pool* fue usado como control de verificación de equipo PFA-100. La sangre citratada restante de los 6 tubos fue usada para el *pool* de verificación del proceso de la agregometría plaquetaria (equipo y reactivos), por lo que se obtuvo un PRP y PPP en *pool*.

Agregometría plaquetaria.

Descripción de la prueba: La agregometría plaquetaria estima la cinética de agregación de las plaquetas. Se basa en la observación de las variaciones ópticas en un plasma rico en plaquetas provocado por el cambio en el paso de luz desde un inicio, cuando se considera 0% de agregación hasta un punto máximo que depende de la agregación de las plaquetas permitiendo el paso de luz en la muestra inducida por la adición de diferentes agonistas, como ADP, epinefrina, colágena y ácido araquidónico.

Material necesario.

Equipos.

- Agregómetro Chrono-log M-560CA.
- Centrifuga.
- Contador automatizado de células sanguíneas.

Muestras biológicas.

- Sangre entera citratada.

Material adicional.

- 8 celdas de lectura.
- 6 barras magnéticas pequeñas.
- Pipeta de 2-20µL.
- Pipeta de 100-1000µL

Reactivos.

- ADP 10 y 5 μ M
- Epinefrina 10 y 5 μ M
- Ácido araquidónico 0.5 mM
- Colágena 1mg/mL.

Procedimiento:

- 1.-Centrifugar la muestra a evaluar a 106xg por 5 minutos para obtener Plasma Rico en Plaquetas (PRP).
- 2.-Separar el PRP. Contar el número de plaquetas y obtener el volumen plaquetar medio en el contador automatizado de células.
- 4.-Centrifugar la muestra residual a 1301xg por 20 minutos para obtener Plasma Pobre en Plaquetas (PPP).
- 4.- Ajustar la cuenta plaquetaria del PRP a una concentración final de 250,000 plaquetas/ μ L empleando el PPP para obtener un tercer plasma llamado plasma ajustado (PA).
- 5.- Pipetear 400 μ L del PA en 6 celdas de lectura a las que previamente se les debe adicionar una pequeña barra magnética que ayudará a que las plaquetas entren en contacto entre sí y con el agonista adicionado.
- 6.- Pipetear 400 μ L de PPP en 2 celdas de lectura, estas celdas se usaran como celdas de referencia.
- 7.-Encender el equipo y esperar a que alcance una temperatura de 37 $^{\circ}$ C.
- 8.-Colocar las celdas de lectura y celdas de referencia en el lugar correspondiente dentro del agregómetro para comenzar la prueba.
- 9.-Inducir la agregación plaquetaria adicionando por separado los diferentes agonistas al plasma ajustado.
- 10.-Mediante el software *Aggrolink* obtener el registro gráfico de la cinética de agregación plaquetaria. La prueba se detiene una vez que se alcanza el punto máximo de agregación y la curva se estabiliza por un minuto. El tiempo mínimo de la prueba debe ser de 8min.
- 11.- Realizar el análisis de las curvas para obtener la lectura final y con ello la agregación máxima alcanzada por cada paciente ante cada agonista. Los resultados se obtienen en porcentaje de agregación.

PFA-100

Descripción de la prueba. El PFA-100 es un sistema para analizar la función plaquetaria en el cual la sangre entera citratada se aspira a través de un capilar por vacío. El equipo hace pasar la sangre a través de un orificio dentro de una membrana recubierta con diferentes agonistas colágena/ADP, colágena/epinefrina o ADP/PGE₂. Estos agonistas inducen la adhesión, la activación y la agregación plaquetaria que conduce a la oclusión rápida del orificio. El equipo reporta el tiempo que tarda la muestra en ocluir el orificio.

Material necesario.

Equipo.

- PFA-100 (Siemens Health Diagnostics Products GMBH, Marburg, Germany).

Muestras biológicas.

- Sangre entera citratada.

Material adicional.

- Pipeta de 100-1000µL.
- Cartuchos de prueba COL/ADP, COL/EPI e *Innovance P2Y*.

1.- Antes de realizar la prueba, se permiten que los cartuchos alcancen la temperatura ambiente del laboratorio (ya que se conservan a 4°C de acuerdo a las especificaciones del fabricante).

2.- Abrir el cartucho de prueba a usar.

3.- Antes de pipetear la fracción de muestra a usar, la muestra de sangre entera se mezcla por inversión suave varias veces.

4.- Se pipetea en el sitio de depósito de muestra 800µL de sangre entera evitando generar burbujas.

5.-Se coloca el cartucho en la posición A del PFA-100. Se Realizan todas las pruebas en esta posición.

6.-Se registra el tiempo de oclusión reportado por el equipo.

El tiempo máximo de la prueba es de 300s, si después de ese tiempo la muestra no ocluye la apertura, el equipo reportará *excedido el tiempo máximo >300s*. Para fines estadísticos este valor fue registrado como 301s.

VARIABLES HEMOSTÁTICAS.

La determinación de estas variables para el grupo CPN se realizó en el equipo BCS-XP (Siemens Health Diagnostics Products GMBH, Marburg, Germany).

Para la determinación de Fibrinógeno se utilizó: *Multifibre U*, para el factor VIII: *Factor Deficient VIII*, para la determinación de FvW por el método antigénico: *BC VWF*, para la determinación de FvW cofactor ristocetina: *VWF AG* e *Innovance D-Dimer* para Dímeros D; todos los reactivos pertenecen a la casa comercial Siemens Health Diagnostics Products.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

De acuerdo al tipo de distribución de la población, normal o anormal, los resultados de variables numéricas se expresan con media \pm desviación estándar (D. E.) ó mediana e intervalos de acuerdo a las percentilas 5 y 95. Se aplicaron pruebas de ANOVA para encontrar diferencias entre grupos (control vs enfermos, mujeres vs hombres) para las variables de distribución normal y Prueba de U de Mann Whitney para variables de distribución anormal. Se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson y Spearman según correspondiera. Se obtuvo el valor de κ para la concordancia del método de PFA-100 (cartuchos) con respecto al método de referencia (agregometría plaquetaria con ADP 10mM y epinefrina 10mM). Se consideró una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$. Se utilizó el programa SPSS versión 9.0.

IV.- RESULTADOS.

Para el grupo de Control de Población Normal (CPN) originalmente se reclutaron 37 donadores sanos, sin embargo, 3 de ellos fueron excluidos

debido a que mostraron alteración de la función plaquetaria y no podía descartarse el uso de medicamentos que afecten la función de las plaquetas. De las 34 personas que formaron este grupo, 17 fueron mujeres. La edad media del grupo fue de 32.8 ± 8.2 años, estatura de 1.60 ± 0.079 m y peso de $75 (54.5-107.6)$ kg.

Durante la prueba de agregación plaquetaria, cuando las plaquetas del plasma rico en plaquetas se activan y agregan permitiendo un mayor paso de luz, se genera un cambio en la densidad óptica que mediante un registro del cambio de voltaje, genera una gráfica, que se interpreta con el software *Aggrolink* del punto más alto de la gráfica con respecto a la línea basal se obtienen las Unidades Arbitrarias que por referencia a las obtenidas en el pool de donadores sanos del día, nos permite calcular el porcentaje de agregación máximo (PAM) tanto en los sujetos normales como en los enfermos; en la **figura 9** se muestran ejemplos de las gráficas que se obtuvieron, A) en Control de Población Sana, B) enfermo con efecto de antiagregación por tienopiridina y aspirina, C) enfermo con resistencia a los antiagregantes mencionados.

Figura 9. Gráficas de agregación plaquetaria.

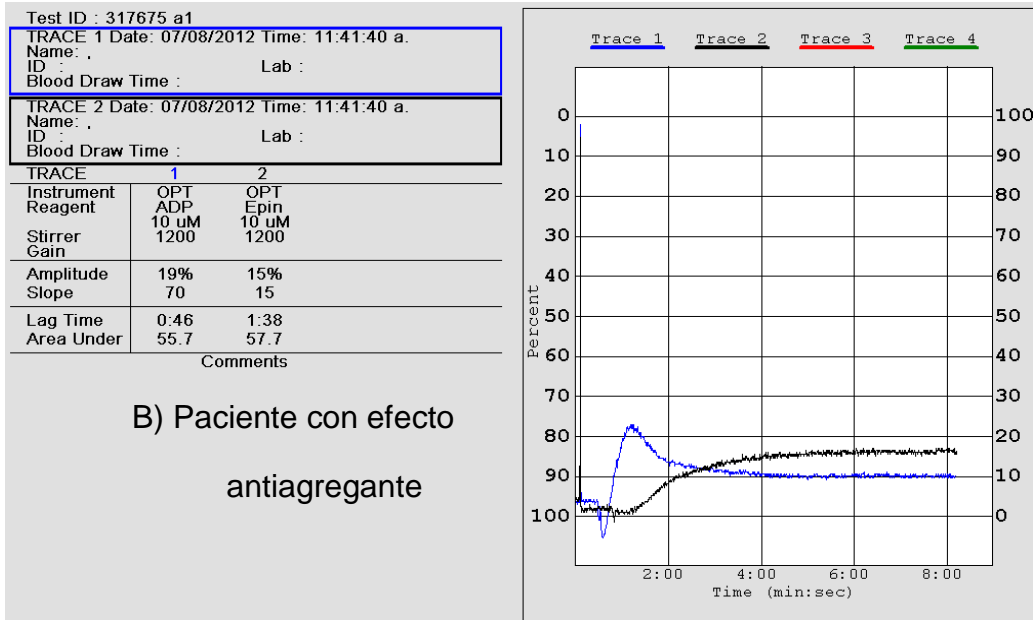
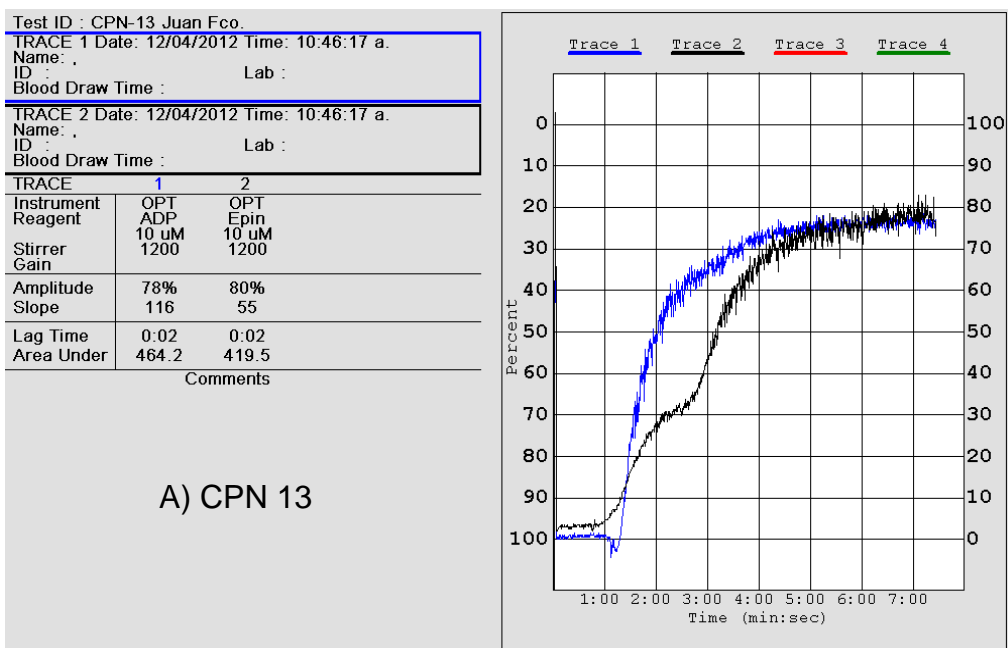
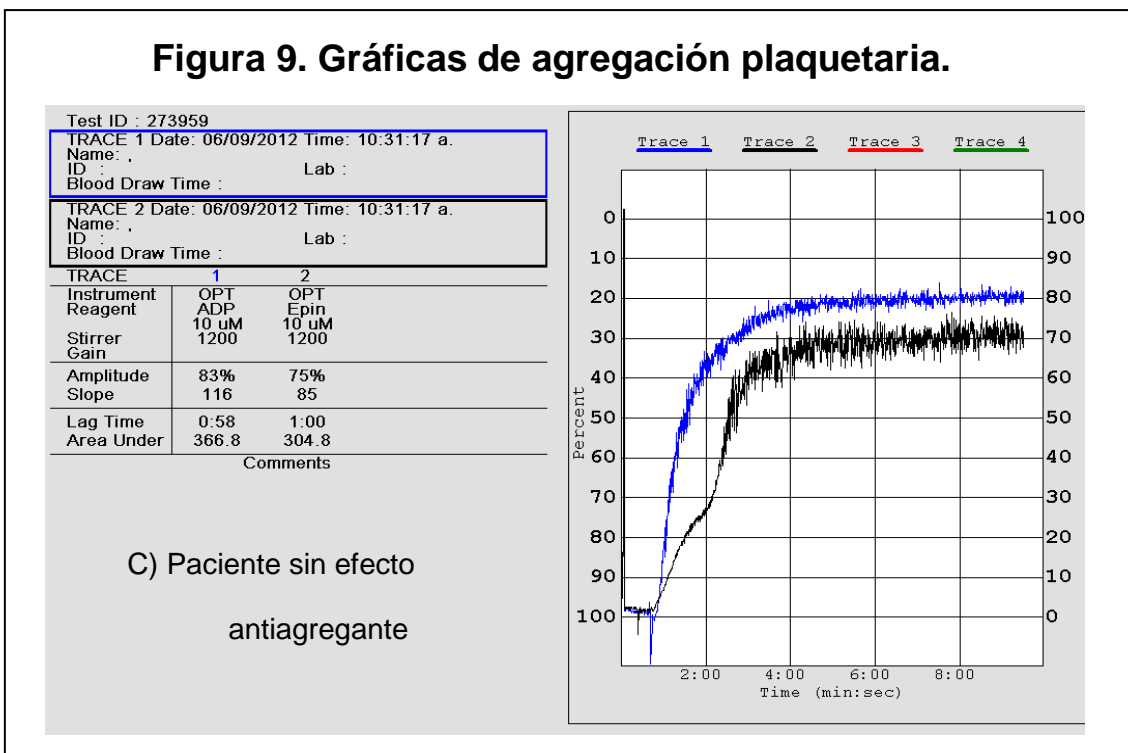


Figura 9. Gráficas de agregación plaquetaria.



Las unidades arbitrarias del *pool* de donadores se consideran como el 100% de agregación; para obtener el porcentaje de agregación en los pacientes se utiliza el siguiente cálculo:

$$PAM_{\text{PACIENTE}} = \frac{UA_{\text{PACIENTE}} + 100\%}{PAM_{\text{POOL}}}$$

De las **tablas 1** a la **3**, se muestran los resultados del grupo CPN, **tabla 1**: resultados de agregometría plaquetaria. **Tabla 2**: se presentan los resultados del equipo PFA-100 con los cartuchos comerciales COL/ADP y COL/Epi así como del *Innovance-P2Y*. **Tabla 3**: resultados de otras variables hemostáticas.

Tabla 1. Variables de agregometría en CPN		
Variables de agregometría	M o Me	DE o intervalos
PRP (plaquetas/ μ L)	8.20	1.26
VPM (fL)	398.40	123.6
PAM ADP 10 μ M (%)	97.1	21.5
PAM Epinefrina 10 μ M (%)	97.4	19.78
PAM AA 0.5Mm (%)	98.72	41.86-112.3
PAM Colágena 1 mg/mL. (%)	98.7	48.5-118.5
PAM ADP 5 μ M (%)	86.2	28.0-112.5
PAM Epinefrina 5 μ M (%)	96.1	7.5-122.8

M: Media, Me: Mediana, DE: Desviación Estándar, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, VPM: Volumen Plaquetario Medio, PAM: Porcentaje de Agregación Máxima.

Tabla 2. Variables de PFA-100 en CPN.		
Variables PFA-100	M o Me	DE o intervalos
TO COL/ADP (s)	98.15	15.9
TO P2Y (s)	70.5	12.75
TO COL/Epi (s)	137.03	29.3

M: Media, Me: Mediana, DE: Desviación Estándar, TO: tiempo de oclusión.

Tabla 3. Variables Hemostáticas relacionadas en CPN.		
Variables hemostáticas	M o Me	DE o intervalos
Fg (g/L)	2.5	1.97-3.79
fVIII (% de actividad)	92.5	52.1-178.2
FvW _{ris} (%)	103.4	64.8-222.5
FvW _{antig.} (%)	79.9	54.2-199.0
DD (μ g/mL)	0.25	0.21-0.52

M: Media, Me: Mediana, DE: Desviación Estándar, Fg: fibrinógeno, fVIII: Factor VIII, FvW_{ris}: Factor de von Willebrand (prueba de cofactor ristocetina) FvW_{antig.}: Factor de von Willebrand (método antigénico), DD: Dímero D.

Con estos resultados se establecieron los valores esperados en población normal sin tratamiento antiagregante.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los 177 pacientes que ingresaron al protocolo. Los cuales presentaron una edad promedio de 54.45 \pm

16.14 años; en las **tablas 4 y 5**, se muestran para el grupo total de enfermos, los resultados de agregometría plaquetaria y los obtenidos en el equipo PFA-100 con los cartuchos comerciales COL/ADP y COL/Epi así como con el *Innovance-P2Y*. De los 177 pacientes, 122 fueron hombres y 55 mujeres. Las mujeres presentaron valores significativamente elevados con respecto a los hombres en el VPM (mujeres: 8.14 vs hombres: 7.87, $p= 0.019$) y en el porcentaje de agregación máxima (PAM) obtenido con ácido araquidónico a una concentración de 0.5mM, (mujeres: 6.99 vs hombres: 5.18, $p= 0.025$), mientras que los hombres mostraron un PAM mayor por Epinefrina a concentración de 10 μ M, (mujeres: 25.74 vs hombres: 48.5, $p= 0.04$).

Tabla 4. Variables de agregometría en Pacientes. N=177		
Variables de agregometría	M o Me	DE o Intervalos
PRP (plaquetas/ μ L)	418.66	183.4
VPM (fL)	8.04	183.4
PAM ADP 10 μ M (%)	63.05	26.0
PAM Epinefrina 10 μ M (%)	49.0	32.1
PAM AA 0.5Mm (%)	5.68	1.36-106.33
PAM Colágena 1 mg/mL (%)	63.74	6.8-104.8
PAM ADP 5 μ M (%)	52.19	23.58
PAM Epinefrina 5 μ M (%)	37.55	3.12-101.26

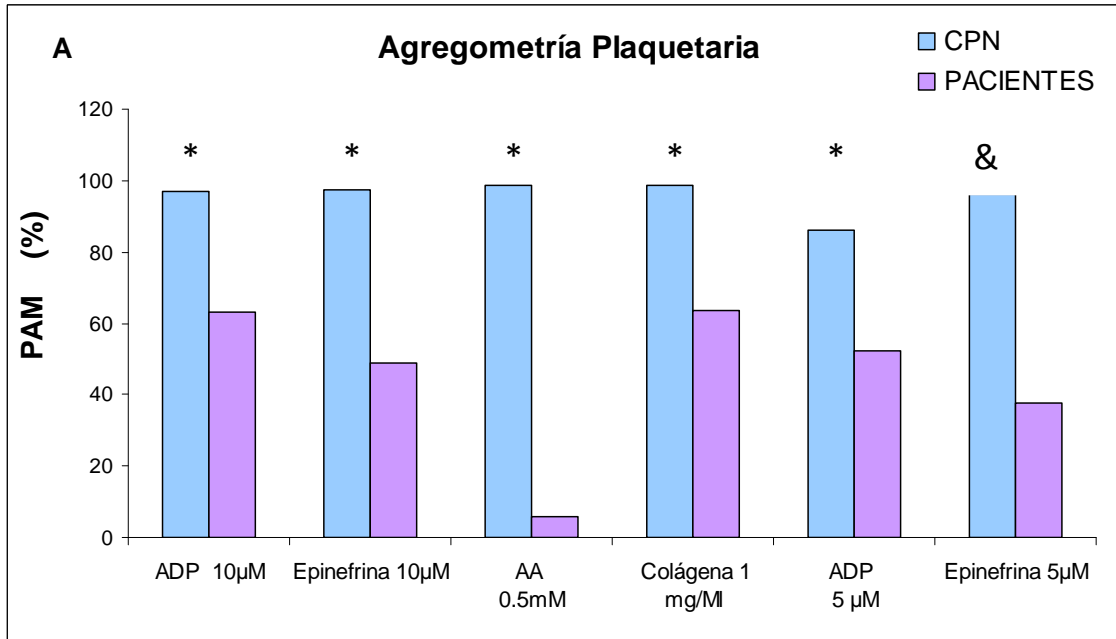
M: Media, Me: Mediana, DE: Desviación Estándar, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, VPM: Volumen Plaquetario Medio, PAM: Porcentaje de Agregación Máxima.

Tabla 5. Variables de PFA-100 en Pacientes. N=177		
Variables PFA-100	Me o Me	DE o intervalos
TO COL/ADP (s)	114.67	68.17
TO P2Y (s)	106.92	83.33
TO COL/Epi (s)	193.35	83.69

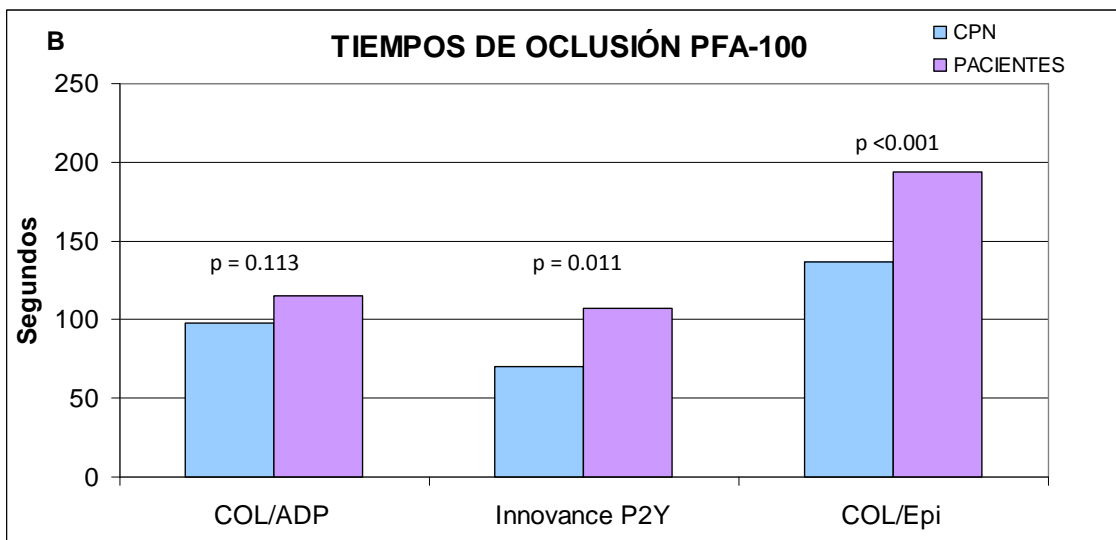
M: Media, Me: Mediana, DE: Desviación Estándar, TO: tiempo de oclusión.

En la **figura 10** se muestran los resultados de evaluación de la función plaquetaria del grupo de CPN vs los enfermos, tanto por agregometría plaquetaria como por el método PFA-100.

Figura 10: Función plaquetaria por agregometría plaquetaria y tiempo de oclusión en grupos CPN y pacientes.



&: $p = 0.001$, *: $p < 0.001$



Las **figuras** de la 11 a la 15 muestran la dispersión de los valores obtenidos en la agregación plaquetaria para cada agonista y sus diferentes concentraciones así como los tiempos de oclusión para cada cartucho. Se muestran los puntos de corte que se establecieron para diferenciar pacientes que presentaron resultados por arriba y por debajo de los puntos de corte para cada método.

Figura 11. Distribución de valores de porcentajes de agregación máxima con ADP 10µM.

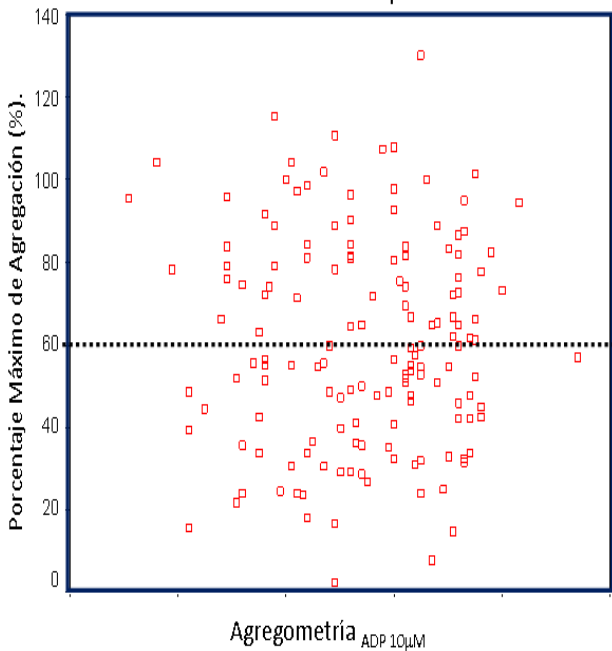


Figura 12. Distribución de valores de Tiempo de oclusión Cartucho Innovance-P2Y

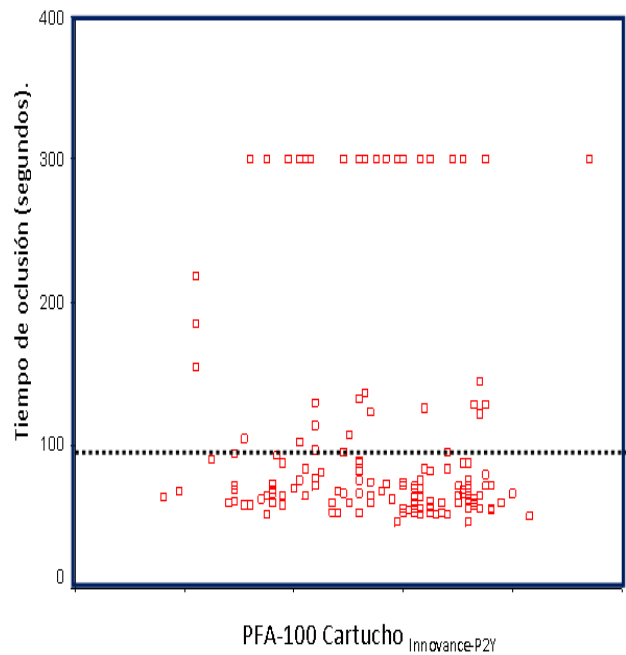
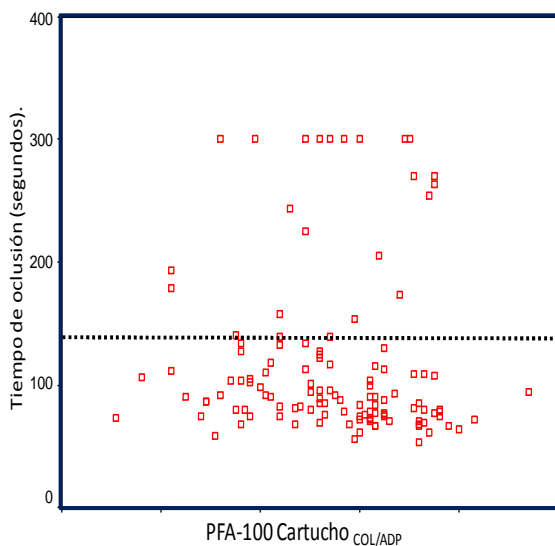


Figura 13. Distribución de valores de Tiempo de oclusión Cartucho COL/ADP



Distribución de resultados obtenidos en las diferentes pruebas para evaluar **la sensibilidad/resistencia a la acción de las tienopiridinas**. El punto de corte fue de 60% para la agregometría plaquetaria inducida con ADP 10µM, de 92s para el cartucho Innovance-P2Y del PFA-100 y de 130s para el cartucho COL/ADP del PFA-100.

Figura 14. Distribución de valores de porcentajes de agregación máxima con Epinefrina 10µM.

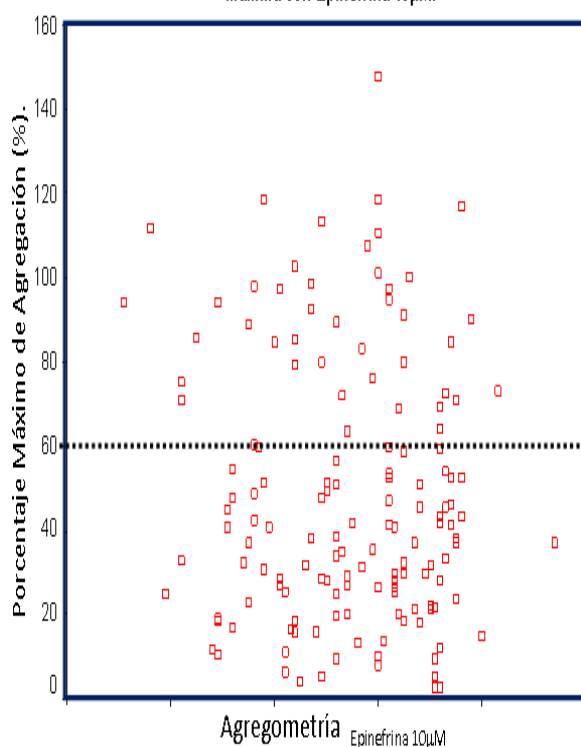
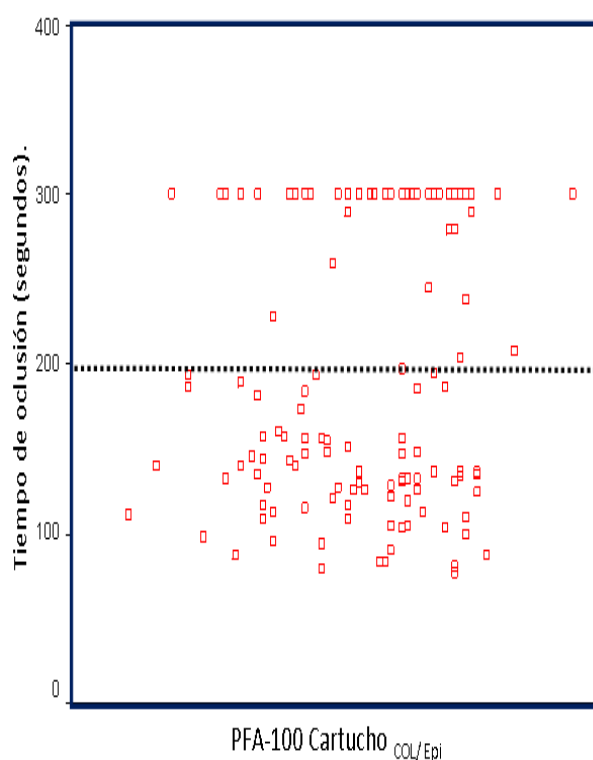


Figura 15. Distribución de valores de Tiempo de oclusión Cartucho COL/Epi.



Distribución de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas para evaluar la sensibilidad/resistencia a la acción de la aspirina. El punto de corte fue de 60% para la agregometría plaquetaria inducida por epinefrina 10µM y de 196 segundos para el cartucho COL/Epi del PFA-100.

La prevalencia de resistencia a tienopiridinas fue de 26.2% y de resistencia a aspirina de 24.3%.

Como parte de la comparación de los métodos, se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman para algunos de los parámetros que se utilizan en la agregometría plaquetaria y en este caso, del tiempo de oclusión que se obtiene en el método de PFA-100.

Las **tablas 6** a la **9** muestran los coeficientes de correlación entre las Unidades Arbitrarias para cada agonista que se utilizaron y por concentración; los coeficientes de correlación de los PAM para cada agonista y por concentración; así como los coeficientes de correlación entre los valores de TO del PFA-100, unidades arbitrarias y PAM.

Para las cuatro tablas aplica: se acepta que un coeficiente de correlación entre 0 y 0.2 no muestra correlación, entre 0.21 y 0.4 muestra correlación baja, entre 0.41 y 0.6 muestra correlación moderada, de 0.61 a 0.8 muestra correlación considerable y correlación > 0.81 muestra buena correlación. * $p= 0.02-0.05$, ** $p= 0.001-0.01$ *** $p<0.001$ &= p sin significancia estadística.

Tabla 6. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE UNIDADES ARBITRARIAS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA					
Unidades Arbitrarias	Unidades Arbitrarias de Agregación Plaquetaria				
	ADP 10 μ M	ADP 5 μ M	Epinefrina 10 μ M	Epinefrina 5 μ M	Colágena 1mg/mL
AA 0.5mM	0.155&	0.141&	0.440***	0.348**	0.247**
ADP 10 μ M	-	0.869***	0.375***	0.450***	0.641***
ADP 5 μ M	-	-	0.346**	0.474***	0.515***
Epinefrina 10 μ M	-	-	-	0.821***	0.470***
Epinefrina 5 μ M	-	-	-	-	0.487***

Tabla 7. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE PORCENTAJES DE AGREGACIÓN					
% Agregación	% Agregación				
	ADP 10 μ M	ADP 5 μ M	Epinefrina 10 μ M	Epinefrina 5 μ M	Colágena 1mg/mL
AA 0.5mM	0.190*	0.171&	0.473***	0.355**	0.210*
ADP 10 μ M	-	0.888***	0.449***	0.449***	0.618***
ADP 5 μ M	-	-	0.368***	0.45***	0.481***
Epinefrina 10 μ M	-	-	-	0.823***	0.438***
Epinefrina 5 μ M	-	-	-	-	0.460***

Tabla 8. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DEL PFA-100 Y UNIDADES ARBITRARIAS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA									
PFA-100 VS U.A.	PFA-100			Unidades Arbitrarias de Agregación Plaquetaria					
	P2Y	COL/ADP	COL/Epi	ADP 10 μ M	ADP 5 μ M	Epinefrina 10 μ M	Epinefrina 5 μ M	Colágena 1mg/mL	AA 0.5mM
P2Y	-	0.584*	0.273**	-0.368*	-0.366*	-0.18**	-0.337&	-0.248**	0.06&
COL/ADP	-	-	0.348**	-0.198**	-0.333**	-0.19**	-0.320**	-0.163&	0.12&
COL/Epi	-	-	-	-0.155&	-0.264**	-0.419*	0.488*	-0.256**	-0.298**

Tabla 9. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DEL PFA-100 Y PAM						
	% Agregación					
PFA-100	ADP 10µM	ADP 5 µM	Epinefrina 10µM	Epinefrina 5µM	Colágena 1mg/mL	AA 0.5mM
P2Y	-0.423***	-0.425***	-0.376***	-0.238 *	-0.278 **	0.011&
COL/ADP	-0.249***	-0.353**	-0.382***	-0.296 *	-0.201*	0.132&
COL/Epi	-0.166***	-0.312**	-0.298**	-0.518***	-0.299**	-0.313***

Para establecer la concordancia entre métodos, se obtuvieron las constantes de Cohen de los resultados obtenidos con los cartuchos del PFA-100; en la **tabla 10** se muestran para la evaluación del efecto de tienopiridinas, (cartuchos COL/ADP e Innovance -P2Y) y en la **tabla 11** para la evaluación del efecto de ASA (cartucho COL/Epi), en los dos casos contra la agregación plaquetaria que se considera el “gold estándar”, en el primero contra la agregación inducida por ADP 10 y 5 µM y en el segundo caso contra la agregación inducida por epinefrina a 10 y 5 µM.

Para las **tablas 10** y **11** aplica: se acepta que una κ estadística de 0 tiene un pobre grado de concordancia, entre 0.01 y 0.20 tiene un grado de concordancia leve, entre 0.21 y 0.40 tiene un grado de concordancia aceptable, entre 0.41 y 0.60 tiene un grado de concordancia moderado, entre 0.61 y 0.80 tiene un grado de concordancia considerable y >0.81 tiene un grado de concordancia casi perfecto.

Tabla 10. Fuerza de concordancia entre la agregometría y el PFA-100				
	ADP 10 µM		ADP 5µM	
	κ estadística	P	κ estadística	p
P2Y	0.397	<0.001	0.27	<0.001
COL/ADP	0.16	0.27	0.17	0.04

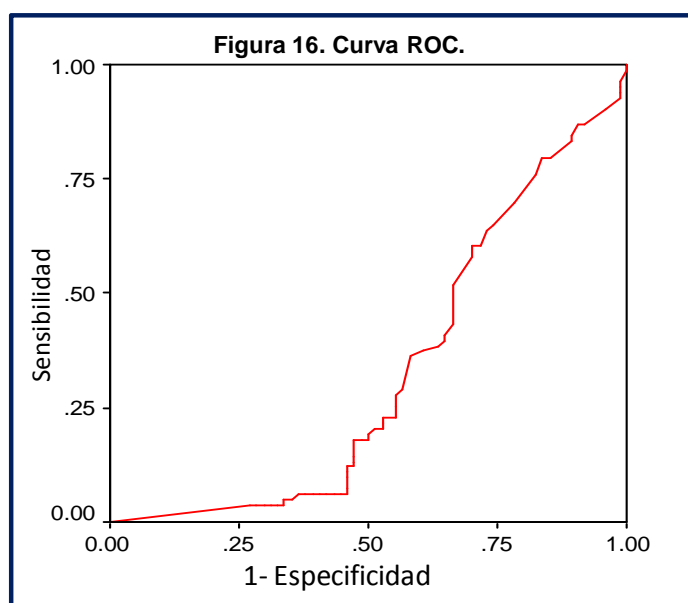
Tabla 11. Fuerza de concordancia entre la agregometría y el PFA-100						
	Epinefrina 10 μ M		Epinefrina 5 μ M		AA 0.5mM	
	<i>K</i> estadística	<i>p</i>	<i>K</i> estadística	<i>p</i>	<i>k</i> estadística	<i>p</i>
COL/Epi	0.33	<0.001	0.3	0.001	0.19	0.003

En la **tabla 12** se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, así como el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) del método de PFA-100 contra el método de referencia.

Tabla 12. Sensibilidad , Especificidad, VPP y VPN de los métodos estudiados				
Cartucho	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
P2Y	92.8	28.6	65.8	85.0
COL/ADP	87.0	28.6	57.1	66.6
COL/EPI	87.2	53.5	46.6	90.0

VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor predictivo Negativo

En la **figura 16** se muestra la curva ROC que se obtuvo para establecer el mejor punto de corte del método del PFA-100 con el cartucho Innovance-P2Y con respecto al método de referencia.



V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La agregometría plaquetaria permite evaluar el efecto de antiagregantes como las tienopiridinas que actúan sobre los receptores de ADP⁴⁰ y el ASA, que inhibe la formación del TxA₂⁴¹.

Para el monitoreo del tratamiento antiagregante de clopidogrel, prasugrel y ticagrelor (tienopiridinas), por agregometría plaquetaria se utilizó Adenosín difosfato a dos concentraciones diferentes: 10 y 5 μ M, contra las que se compararon los resultados obtenidos por los cartuchos que evalúan la función plaquetaria dependiente de ADP: COL/ADP e *Innovance-P2Y*, diseñado específicamente para este efecto. El efecto de las tienopiridinas puede medirse dos horas después de su ingesta.

El efecto de la aspirina se evalúa por la agregación inducida con epinefrina, que nos permite monitorizar el efecto de la aspirina que lleva hasta una semana en el torrente sanguíneo, mientras que el ácido araquidónico nos permite evaluar el efecto de la ingesta del medicamento 24 horas antes de la realización de la prueba. Utilizamos dos concentraciones diferentes de epinefrina: 10 y 5 μ M y ácido araquidónico a 0.5mM, mientras que para el PFA-100 se evaluó el cartucho COL/Epi y se contrastaron los resultados.

En la literatura se reportan diferentes valores para los puntos de corte de prácticamente todas las pruebas que evalúan la función de las plaquetas, tanto para distinguir a la población sana de las que tienen disfunción plaquetaria como para distinguir entre las personas que tienen efecto adecuado de los medicamentos antiagregantes y los que no^{56 57 58}. Por tal motivo, se establecieron los valores para cada prueba: concentraciones de agonistas y cartuchos comerciales (**tabla 2**).

En el laboratorio de Trombosis, Fibrinólisis y Función se establecieron con anterioridad los puntos de corte para agregometría plaquetaria: PAM con ADP 10 y 5 mM \leq 60%; PAM con Epinefrina 10 y 5 mM \leq 60%.

Los valores obtenidos en la población de enfermos en la medición de la función plaquetaria por agregometría, fueron significativamente menores comparados con los valores obtenidos en la población control (**figura 10 A**), lo que nos dice que muchos de los enfermos estudiados, se encontraban bajo efecto antiagregante. Por su parte, el método del PFA-100, mostró que el TO fue significativamente mayor sólo con los cartuchos: Innovance-P2Y y COL/Epi, lo cual indica el efecto de las tienopiridinas y la aspirina sobre el grupo de enfermos, el cartucho COL/ADP no mostró diferencia significativa (**figura 10 B**), resultado reportado con anterioridad.

La prevalencia de resistencia al clopidogrel en la etapa crónica del tratamiento se ha reportado con valores tan elevados como 70%, sin embargo, son pocos los trabajos realizados en esta etapa, ya que generalmente se evalúa trans y post coronarioangiografía, que es un momento trascendental en el que eventualmente, se busca el efecto de los antiagregantes y, además, las dosis son de hasta tres veces la diaria en la etapa crónica. La prevalencia que se encontró coincide con lo reportado en la literatura,^{59 60} se considera que la resistencia a los antiagregantes puede ser un indicador de mal pronóstico para los pacientes que la presentan y que podría relacionarse con concentraciones elevadas de factor de von Willebrand y factor VIII, así como proteína C reactiva,⁶¹ lo que en conjunto podría reflejar un estado crónico de inflamación que facilitarían la reincidencia de eventos coronarios. La amplia prevalencia de diabetes mellitus, dislipidemias y obesidad en nuestra población podría estar

relacionada con una mayor prevalencia de resistencia. Es necesario dar seguimiento a los enfermos que muestran un efecto disminuido de su antiagregación para, en su caso, modificar el tratamiento por alguno de los nuevos antiagregantes que no dependen del metabolismo en el hígado para ejercer su actividad.

En cuanto a la valoración del Sistema del PFA-100 con la prueba considerada como estándar de oro y en la cual, el Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis del Instituto Nacional de Cardiología tiene amplia experiencia, los resultados obtenidos en primer lugar para los coeficientes de correlación, muestran en la **tabla 6** que los coeficientes de correlación entre las unidades arbitrarias de la agregometría por ADP 10 μ M y 5 μ M así como de la Epinefrina 10 μ M y 5 μ M muestran buena correlación entre sí (CC>0.81), mientras que entre unidades arbitrarias de diferentes agonistas, la correlación apenas fue moderada (CC<0.6). Sin embargo, la activación por ADP 5 μ M se ve afectada por la presencia de aspirina, por lo que la concentración de ADP 10 μ M sería la más adecuada para evaluar inhibidores del P2Y₁₂; el ácido araquidónico correlacionó como se esperaba con las diferentes concentraciones de epinefrina, ya que ambos agonistas permiten evaluar aspirina.

En la **tabla 7** se observa que los PAM entre las concentraciones de ADP 10 y 5 μ M al igual que los de la Epinefrina 10 y 5 μ M, son buenos, incluso son ligeramente mayores que con respecto a las unidades arbitrarias, esto podría deberse a que el cálculo que usa como referencia las unidades arbitrarias del pool del día, permite atenuar las modificaciones graduales de los reactivos que se presentan aún en congelación a -70°C.

La colágena es un agonista fuerte cuyo efecto activador sobre las plaquetas no se inhibe de manera regular, por lo que no se le utiliza como referencia para el monitoreo de antiagregantes, sin embargo, muestra una correlación importante con la agregación inducida por ADP, lo que implica que las tienopiridinas tienen cierto efecto inhibitorio sobre el complejo receptor de colágena con una correlación que va desde moderada a considerable.

En las **tablas 8 y 9** se observa que la relación inversa entre el de los cartuchos del sistema PFA-100, es decir entre el TO (tiempo en que tarda en ocluirse la microapertura en la membrana por donde fluyen las plaquetas en el sistema), y el PAM de la agregometría, presenta una correlación moderada entre el cartucho nuevo Innovance- P2Y y la agregación inducida por ADP 10 (CC=0.423, $p<0.001$) y 5 μM (0.425, $p<0.001$), aunque se esperaba un valor mayor, ya que fue diseñado específicamente para la valoración del efecto de las tienopiridinas que inhiben a los receptores de ADP.

Un mejor indicador entre la concordancia de los métodos, es la constante de Cohen ó κ (*kappa*), que ayuda a descartar que la correlación ocurriera por una cuestión del azar. Valores cercanos a 1 indicarían qué tanto las unidades reportadas por el sistema de PFA-100 coinciden (en una relación inversa) con los valores de PAM o unidades arbitrarias que se obtienen por la agregometría plaquetaria. En la **tabla 10** se observa que sólo el cartucho Innovance-P2Y muestra una concordancia aceptable con la agregación inducida por ADP 10 μM , mientras que con 5 μM es menor y como era de esperarse, el cartucho COL/ADP mostró una concordancia sin significancia estadística.

Por su parte, en la **tabla 11**, se observa que el valor de κ para el cartucho que de manera general se usa para la valoración de aspirina, muestra un valor con significancia estadística aunque baja.

En cuanto a la sensibilidad del sistema del PFA-100 para establecer si un paciente es sensible/resistente al efecto de antiagregantes, al comparar el sistema con la agregometría plaquetaria, se puede observar en la **tabla 12** que se encontraron valores de sensibilidad superiores al 80%, por lo tanto, podemos decir que las pruebas del PFA-100 tiene una buena sensibilidad. Es decir, los diferentes cartuchos del PFA-100 son capaces de detectar a aquellos pacientes resistentes al efecto antiagregante. Sin embargo, los valores obtenidos para la especificidad fueron menores al 80%, lo que indica que los cartuchos del PFA-100 no son específicos, y tienen una baja probabilidad de obtener un tiempo de oclusión alargado en aquellos pacientes que sí son sensibles a la acción de los antiagregantes. Las propiedades de especificidad y sensibilidad del método que se evaluó, permitieron obtener la curva ROC que se muestra en la última figura, como puede apreciarse, no se observa un comportamiento adecuado del método al pie de la cama con la agregometría.

Los valores predictivos positivos al igual que la especificidad son menores al 80%, esto indica que si en el PFA-100 obtenemos tiempos de oclusión menores o iguales a los valores establecidos como puntos de corte de los diferentes cartuchos, la probabilidad de que este resultado concuerde con que efectivamente el paciente es resistente a la acción de los antiagregantes, es baja. Sin embargo si en el PFA-100 obtenemos tiempos alargados, la probabilidad de que el paciente en efecto sea sensible a la acción de los antiagregantes, es alta.

VI. CONCLUSIONES.

Fue posible evaluar el sistema PFA-100 como prueba para el monitoreo del tratamiento antiagregante. En la población estudiada, bajo los criterios del Laboratorio de Trombosis, Fibrinólisis y Función Plaquetaria del Instituto Nacional de Cardiología, se puede concluir lo siguiente:

- De acuerdo a los resultados obtenidos en la agregometría plaquetaria, la prevalencia de la actividad plaquetaria residual elevada en pacientes que ingieren clopidogrel principalmente, es muy alta, y se debe obtener más información clínica para establecer si efectivamente la resistencia por laboratorio encontrada en estos pacientes, les confiere un riesgo trombogénico o no.
- En cuanto a la evaluación del sistema PFA-100, el cartucho COL/ADP del PFA-100 es poco sensible y específico para la detección del efecto antiagregante inducido por tienopiridinas, lo que concuerda con lo reportado en la literatura.
- Aunque los cartuchos Innovance-P2Y y COL/Epi tienen porcentajes mayores de sensibilidad y especificidad con respecto al cartucho COL/ADP, presentan una baja especificidad, lo que detendría su uso para establecer que hay un grado bajo de inhibición de las plaquetas tratadas con tienopiridinas, a diferencia de lo reportado en otras pruebas del tipo *point-of care* como el Platelet Works y el Verifynow.
- El VPN del PFA-100 para la resistencia a las tienopiridinas es bastante bueno, por lo tanto, si se obtiene un TO alargado, es muy probable que el paciente estudiado tenga un efecto importante de tienopiridinas.

- Si bien el sistema PFA-100 no presenta los criterios adecuados para ser usado como prueba para el monitoreo del tratamiento antiagregante, sí podría usarse en los casos donde se requiera una decisión rápida, por ejemplo, al médico podría servirle para decidir si un paciente bajo tratamiento antiagregante puede entrar o no a cirugía, si el resultado de la prueba indica que el paciente tiene buen efecto antiagregante habrá una alta posibilidad de que el paciente sufra alguna hemorragia durante la intervención.
- Por otra parte, cuando el TO de un paciente bajo tratamiento antiagregante con tienopiridinas o aspirina sea corto, puede ser que en realidad sí tenga un efecto de inhibición al medirlo con el estándar de referencia sin embargo puede inferirse que el paciente posee características que le hacen acortar los tiempos de oclusión y finalmente podría ser que el paciente cursa por una situación de riesgo trombogénico, como podrían ser valores elevados de fibrinógeno y/o factor VIII y von Willebrand.

IV.-BIBLIOGRAFÍA.

- ¹ Sharathkumar A, Shapiro A, Platelet Function Disorders. Treatment of Hemophilia 2008, 19 (2): 1-28.
- ² Calverley D, Thienelt C. Platelet Structure and Function in Hemostasis and Trombosis. Greer J, Foerster J, Rodgers G, Paraskevas F, Glader B, Arber D, Means R, Wintrobe's Clinical Hematology. Vol. 1 12ªEd. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins 2009,p. 490-495,
- ³ Cramer E, Fontenay M. Platelets: Structure related to function. Colman R, Cloves A, Goldhaber S, Marder V, George J. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Practice. 5ª Ed. Philadelphia Lippincott Williams 2006 pag.438-441.
- ⁴ Becker R. Platelet Biology the role of platelets in Hemostasis, Thrombosis and Inflammation. Bhatt D. Platelets in Cardiovascular Disease Vol London. Imperial College Press 2008 pags. 1-23.
- ⁵ García M, Coma C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. Revista Cubana de Angiología y Circulación Vascul ar 2000; 1 (2): 132-141.
- ⁶ Oliver A, Sierra P. Fisiología de la hemostasia. Llau J, Basora M, Gómez A, Moral V. Tratado de medicina transfuncional perioperatoria. Elsevier España. Barcelona 2010 p.49-52
- ⁷ Italiano J. The structure and production of blood platelets. Gresele P, Fuster V, Lopes J, Page C, Vermynen J. Platelets in Hematologic and Cardiovascular Disorders. New York. Cambridge University Press 2007, p. 1-20.
- ⁸ Pujol N. Anatomía ultramicroscópica de las plaquetas interrelaciones estructura-función. Pujol N. Trombocitopenias 2ªEd. Madrid. Harcourt 2002, p. 3-8.
- ⁹ Abrams C, Plow E. The molecular basis of platelet function. Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H. Shilberstein, McGlave P. Hematology: Basic Principles and Practice. 4a Ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone 2005, pag. 1781-1791.
- ¹⁰ Leclair S. Megacariopoyesis Rodak B. Hematología. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. 2ªEd. Buenos Aires. Medica Panamericana. 2005, p. 145-148.
- ¹¹ Mckenzie S. Hemostasia primaria. Santos A. Hematología clínica. Vol. 1. 2ªEd. México. El manual moderno 2000p. 571-595.
- ¹² Harrison P. Platelet function analysis. Blood reviews 2005, 19: 111-123.
- ¹³ Jurk K, Kehrel B. Platelets: Physiology and Biochemistry. Seminars in thrombosis and hemostasis 2005, 31 (4): 381-392.
- ¹⁴ Brass F. The molecular basis platelet activation. Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H. Shilberstein, McGlave P. Hematology: Basic Principles and Practice. 4ª Ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone 2005, p1793-1803.
- ¹⁵ Reiningger A. Platelet function under high shear conditions. Hämostaseologie 2009, 1 :21-24.
- ¹⁶ Murugappan S, Shankar H, Kunapuli S. Platelet Receptors for Adenine Nucleotides and Thromboxane A₂. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2004, 30(4): 411-418.

-
- ¹⁷ Walsh P. Platelet Coagulation-Protein Interactions Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2004, 30(4): 461-471.
- ¹⁸ Lauricella A. Variabilidad de las redes de fibrina. Acta Bioquímica clínica y Latinoamericana 2007, 41 (1) : 7-9.
- ¹⁹ Kickler T. Platelet biology –an overview. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2006. 2 : 79-85.
- ²⁰ Reed G. Platelet Secretion. Michelson A. Platelets. 2^a Ed. San Diego. Elsevier 2007,p. 309-318.
- ²¹ Parise L, Boudignon-Proudhon C, Keely P, Naik U. Platelets in Hemostasis and Trombosis. Greer J, Foerster J, Rodgers G, Paraskevas F, Glader B, Arber D, Means R, Wintrobe's Clinical Hematology. Vol. 1 10^a Ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkinks 1999, p. 661-676.
- ²² Rivera J, Lozano M, Navarro L. et al. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. Hematologica 2009,94: 708.
- ²³ Kreutz R, Nystrom P, Kreutz Y. et al. Inhibition of platelet aggregation by prostaglandin E₁ in diabetic patients durin therapy with clopidogrel and aspirin. Platelets. 2012, 24 (2): 145-150.
- ²⁴ Andrews R, Karunakaran D, Gardiner E. Platelet receptor proteolysis. A mechanism for downregulation platelet reactivity. Arterioclerosis Thrombosis Vascular Biolgy 2007, 27 : 1511-1520.
- ²⁵ Mori E. Antiagregantes plaquetarios. Revista Peruana de Cardiología. 2006, 32 (1): 29-38.
- ²⁶ Flier J, Underhill L. Platelet-Endothelium interactions. The New England Journal of Medicine 1993, 328 (9) 628-630.
- ²⁷ Beumer S, IJsseldijk M, de Groot P. et al. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5 and inhibition by heparin. Blood 1994, 84: 3724-3733.
- ²⁸ Toneguzzo J, Fourçans G, Gagliardo E. et al. Trastornos plaquetarios. Cátedra de Clínica Médica y Terapéutica y la Carrera de Posgrado de especialización en Clínica Médica. 2009. 1: 1-13.
- ²⁹ Simon D, Kunicki T, Nugent D. Platelet function defects. Haemophilia 2008, 14: 1240-1249.
- ³⁰ Lozano M, Rivera J, García V. Alteraciones de las plaquetas. Etiopatogenia, clasificación, manifestaciones clínicas diagnóstico y actitudes terapéuticas. Medicine 2004, 9 (22): 1379-1392.
- ³¹ http://www.alcles.org/publicaciones/folletos_medicos/Enfermedad%20de%20Von%20Willebrand.pdf
- ³² Bosque A. Síndromes Coronaries Agudos. Revista de la Facultad de medicina 2005, 48 (2) : 65-67.
- ³³ Fajuri A. Síndrome Coronario Agudo, lo que se debe saber el médico no especialista. Boletín Escuela de Medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile 2008, 33(1) 31-33.

-
- ³⁴ Badimon L, Vilahur G, Padro T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Revista Española de Cardiología* 2009,62(10): 1161-1178.
- ³⁵ Kaplan Z, Jackson S. The role of platelets in Atherothrombosis. *American Society of Hematology* 2011, 51-61.
- ³⁶ Hernández S. Fisiopatía de los síndromes coronarios agudos. *Archivos de Cardiología de México* 2007, 77(4), 219-224.
- ³⁷ Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular Research* 2003 , 61 : 498-511.
- ³⁸ Badimon L, Vilahur G. Enfermedad aterotrombótica coronaria: avances en el tratamiento antiplaquetario. *Revista Española de Cardiología* 2008, 61 (5): 501-513.
- ³⁹ Kim S, Kunapuli S. P₂Y₁₂ receptor in platelet activation. *Platelets* 2011,22 (1) 56-57.
- ⁴⁰ Ferraris V, Saha S, Oestreich J. et al. Update to the Society of Thoracic Surgeons guideline on use of antiplatelet drugs in patients having cardiac and noncardiac operations. *The annals of thoracic surgery* 2012, 94 : 1761-1781.
- ⁴¹ Bonello L, Tantry U, Marcucci R, et al. Consensus and future directions on the definition of High On.Treatment Platelet Reactivity to Adenosine Diphosphate. *Jour Am Coll Card* 2010, 56 (12):920-93.
- ⁴² Montalescot G. Platelet Biology and Implications for antiplatelet Therapy in Atherothrombotic. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2011, 17 (4) 375.
- ⁴³ Agah R, Plow E, Topol E. αIIbβ3 (GPIIb-IIIa) Antagonist. *Michelson A. Platelets. 2ª Ed. San Diego. Elsevier* 207,p.1145-1148.
- ⁴⁴ Palomo I, Torres C, Moore-Carrasco R. et al. Antiagregantes plaquetarios: mecanismos de acción y riesgos asociados al uso. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de Colombia* 2009,16 (1): 133-143.
- ⁴⁵ Córdova V, Vargas P Vega C. et al. Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria, *Medicina Interna De México*, 2011,27 (1) 58-74.
- ⁴⁶ Douglas J, Thrity A, Leonthena R, et al. Platelet Function Testing by aggregometry; approved guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute H58-A* 2008; 28(31).
- ⁴⁷ van Werkum J, Harmsze A, Bouman H, ten Berg J, Hackeng C. The use of the verifynow system to monitor antiplatelet therapy: a review of the current evidence. *Harmsze A. Influence of genetic variants and drug interactions on the response to antiplatelet drugs. FSC. Netherlands* 2011p. 25-38.
- ⁴⁸ Michelson A, Frelinger A, Furman M. et al. Current Options in Platelet Function Testing. *Am J Cardiol* 2006, 98: 4N-10N.
- ⁴⁹ Nicholson N, Panzer-Knodle S, Hass N. et al. Assessment of platelet function assays. *American heart journal* 1988, 135 (5): 170-178.
- ⁵⁰ Harrison P, Keeling D. Clinical Tests of Platelet Function. *Michelson A. Platelets. 2ª Ed. San Diego. Elsevier* 207,p. 445-459.

-
- ⁵¹ Blanco J, Bartolomé B, Juzgado A. et al. Valoración del sistema PFA-100 para la determinación del tiempo de hemorragia en cirugía oral. *Medicina Oral Patológica y cirugía Bucal* 2006, 11 (514-519).
- ⁵² McGlasson D, Shah A, Fritsma G. Ability of Innovanse PFA P₂Y system to detect clopidogrel-induced ADP receptor blockade in preangioplasty individuals. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2011, 22 (7): 583-587.
- ⁵³ Dyskiewicz-Korpanty A, Olteanu H, Frenkel EP, et al. Clopidogrel antiplatelet effect: an evaluation by optical aggregometry, impedance aggregometry and the platelet function analyzer (PFA-100). *Platelets* 2007, 18: 491-496.
- ⁵⁴ Muller T, Dieplinger B, Poelz W. et al. Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer: comparison with two flow cytometric methods. *Thromb Res* 2007, 12:249-258.
- ⁵⁵ McGlasson D, Shah A, Fritsma G. Ability of the INNOVANCE PFA P₂Y system to detect clopidogrel-induced ADP receptor blockade in preangioplasty individuals. *Blood coagulation and fibrinolysis*. 2011, 22 (7): 583-584.
- ⁵⁶ Böck M, De Haan J, Beck KH. et al. Standardization of the PFA-100 platelet function test in 105 mmol/l buffered citrate: effect of gender, smoking and oral contraceptives. *British Journal of Haematology* . 1999, 106(4):898-904.
- ⁵⁷ Wuillermin W, Gasser K, Zeerleder S. et al. Evaluation of a Platelet Function Analyser (PFA)-100 in patients with bleeding tendency. *Swiss Med WKLY*. 2002, 132: 443-448.
- ⁵⁸ Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E. et al. A comparison of six major platelet function test to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *European Heart Journal*. 2007, 28: 1702-1708.
- ⁵⁹ Keinsella J, Tobin W, Cox D. et al. Prevalence of Ex Vivo High On-treatment Platelet Reactivity on Antiplatelet therapy after transient ischemic attack or ischemic stroke on the PFA-100 and VerifyNow. *Journal of Stroke Cerebrovascular Diseases*. 2012, 100 (1): 1-9.
- ⁶⁰ Bliden K, Storey R, Jeong Y. et al. The effect of ticagrelor versus clopidogrel on high on-treatment platelet reactivity : combined analysis of the onset/offset and respond studies. *American Heart Journal*. 2011, 162 (1): 160-165.
- ⁶¹ Haubelt H, Anders C, Vogt A. et al. Variables influencing Platelet Function Analyzer-100 closure times in healthy individuals. *British Journal of Haematology*. 2005, 130 (5): 759-767