

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Implicación del sistema de la óxido nítrico sintasa tipo 3 en la respuesta funcional de las plaquetas al ácido acetilsalicílico

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Pablo Rodríguez Sierra

Directores

Antonio J. López Farré
Carlos Macaya Miguel

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



***IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA TIPO 3 EN
LA RESPUESTA FUNCIONAL DE LAS PLAQUETAS AL ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO***

TESIS DOCTORAL

Pablo Rodríguez Sierra

Unidad de Investigación Cardiovascular. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

DIRECTORES DE TESIS:

DR. ANTONIO J. LÓPEZ FARRÉ

DR. CARLOS MACAYA MIGUEL

Dr. Antonio J. López Farré, Profesor Asociado. Jefe de la Unidad de Investigación Cardiovascular del Servicio de Cardiología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Dr. Carlos Macaya Miguel, Catedrático-Jefe del Servicio de Cardiología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

CERTIFICAN:

Que Don Pablo Rodríguez Sierra ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA TIPO 3 EN LAS PLAQUETAS EN LA RESPUESTA FUNCIONAL AL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO” con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

Y que conste, expedimos el presente certificado en Madrid a 12 de mayo de 2014.

Dr. Antonio López Farré

Dr. Carlos Macaya Miguel

Este trabajo ha sido apoyado por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social [Redes temáticas de Investigación Cooperativa (RETICs) RD12/0042/0040], Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Fondos FEDER) y Fondos de Investigaciones de la Seguridad Social (PI12/01818).

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mis más sinceros agradecimientos:

A mis dos tutores, el Dr. Antonio López Farré y el Dr. Carlos Macaya Miguel, tanto por su tutela a lo largo de todo este duro proceso de realización de este apasionante trabajo de Tesis Doctoral como por sus enseñanzas diarias en esta bonita profesión que es la Investigación.

A todo el equipo en el que trabajo por tener la inconmensurable labor de aguantarme a diario, soportando todas y cada una de mis excentricidades.

A mis padres y a mi hermana, por todo el sudor y lágrimas que han derramado para que alcanzase mis sueños en la vida.

A Noelia, mi inspiración, por su apoyo incondicional en todos los momentos complicados por los que uno ha de pasar para lograr sus metas.

Al resto de miembros de mi familia, por cada granito de arena que han puesto para que siga adelante con mis sueños.

A mis amigos, aquellos que siempre han estado conmigo para lo bueno y lo malo.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ADMA: Dimetilarginina asimétrica

ADP: Adenosín difosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

ARN: Ácido ribonucleíco

BCA: Ácido bicinconínico

BH4: Tetrahydrobiopterina

CD40L: Ligando de CD40.

CMLV: Células de músculo liso vascular

COX: Ciclooxygenasa

COX-1: Ciclooxygenasa 1

COX-2: Ciclooxygenasa 2

DBP: Proteína de unión a vitamina D

DDAH: Dimetilaminohidrolasa

EEM: Error Estándar de la Media

FRDE: Factor relajante derivado del endotelio

GCS: Guanilato ciclasa soluble

GDP: Guanosín difosfato

GPIb: Glicoproteína Ib

GPIIb/IIIa: Glicoproteína IIb-IIIa

GPVI: Glicoproteína VI

GTP: Guanosín trifosfato

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOS_e: Óxido nítrico sintasa endotelial

NOS_i: Óxido nítrico sintasa inducible

PAF: Factor activador de plaquetas

PAR: Receptor activado por proteasas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-SSCP: PCR de polimorfismo de conformación de cadena simple

PGI₂: Prostaglandina I₂

PPP: Plasma pobre en plaquetas

PRP: Plasma rico en plaquetas

PTI: Púrpura trombocitopénica idiopática

Rpm: Revoluciones por minuto

TC: Tiempo de coagulado

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF: Factor vascular de crecimiento endotelial

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. LA PLAQUETA	6
1.1.1. FUNCIÓN PLAQUETARIA	7
1.1.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN PLAQUETARIA	9
1.1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA PLAQUETA: MECANISMOS DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA	14
1.1.4. MECANISMOS DE INTERACCIÓN PLAQUETA-PLAQUETA	21
1.1.5. INTERACCIÓN DE LA PLAQUETA CON EL ENDOTELIO Y OTRAS CÉLULAS DEL MICROENTORNO VASCULAR	26
1.1.6. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y LA PLAQUETA	27
1.2. TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO: ASPIRINA	27
1.2.1. HISTORIA DE ASPIRINA	27
1.2.2. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMICA DE ASPIRINA	30
1.3. EL ÓXIDO NÍTRICO	50
1.3.1. SÍNTESIS Y FORMACIÓN	50
1.3.2. EL ÓXIDO NÍTRICO Y LA PARED VASCULAR	51
1.3.3. EL ÓXIDO NÍTRICO Y LA PLAQUETA	57
1.3.4. EL PAPEL DE LOS INHIBIDORES DE LA NOS	59
1.4. CONSIDERACIONES	62
2. HIPÓTESIS	64
3. OBJETIVOS	65
4. METODOLOGÍA	66
4.1. INCLUSIÓN DE PACIENTES	67

4.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	67
4.3. IDENTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A ASPIRINA.....	68
4.4 AISLAMIENTO DE PLAQUETAS Y EVALUACIÓN DE LA PUREZA.....	69
4.5. NITRITOS Y NITRATOS LIBERADOS DESDE LA PLAQUETA.....	69
4.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NOS2, NOS3 Y NOS3 FOSFORILADA EN SERINA 1177 MEDIANTE WESTERN-BLOT.....	70
4.7. DETERMINACIÓN DE LA ALTERACIÓN GENÉTICA T-786 → C EN EL GEN NOS3.....	71
4.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ADMA EN EL PLASMA DE LOS SUJETOS INCLUIDOS.....	72
4.9. INDUCCIÓN IN VITRO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN RESPUESTA A COLÁGENO.....	72
4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	73
5. RESULTADOS.....	74
5.1. PRODUCCIÓN DE NITRITOS + NITRATOS Y EXPRESIÓN DE NOS2 Y NOS3 EN LA PLAQUETA	78
5.2. PRESENCIA DE LA ALTERACIÓN -786 (T ⁻⁷⁸⁶ →C) EN EL GEN NOS3.....	79
5.3. EL CONTENIDO PLAQUETARIO DE NOS3 FOSFORILADA EN EL RESIDUO Ser 1177.....	80
5.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE ADMA.....	81
5.5. CAMBIOS EN LA TRANSMISIÓN DE LUZ, LIBERACIÓN DE NITRATOS + NITRITOS Y CONTENIDO DE NOS3 FOSFORILADA EN EL RESIDUO Ser 1177 EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR COLÁGENO.....	82
6. DISCUSIÓN.....	86
7. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO.....	102
8. BIBLIOGRAFÍA.....	104

9. ANEXO.....	130
---------------	-----

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA PLAQUETA

De los tres elementos formes presentes en la sangre, los últimos en ser descubiertos fueron las plaquetas. El retraso de su hallazgo se debió, entre otros factores, a su pequeño tamaño, inferior a todas luces al de los eritrocitos y leucocitos, además de los poco avanzados microscopios que había por aquel entonces y la capacidad de las plaquetas para agregarse. En los primeros años después de la invención del microscopio, se describió en varias ocasiones la existencia de partículas diminutas en la sangre. Entre estos observadores, habría que destacar Antonio van Leewenhoeck (1632-1723), que al estudiar gotas de sangre, describió los glóbulos rojos mencionando a su vez otras partículas de menor tamaño, que podían adherirse unas a otras. Sin embargo, no prestó mayor atención a estas partículas y, de hecho, no se molestó en asignarles nombre alguno. Por otro lado, el inglés William Hewson (1739-1774) aportó grandes conocimientos acerca de la composición y la coagulación de la sangre. En este sentido, describió la coagulación como una propiedad que el plasma poseía, y observó la existencia de una sustancia que precipitaba por calentamiento a 50° C. Hewson le puso el nombre de “linfa coagulable”, aunque esta sustancia no era otra más que el fibrinógeno. A su vez, Hewson realizó dos observaciones importantes que ayudarían al posterior conocimiento de las plaquetas: Por una parte, describió como, tras la adición de sulfato de sodio y otras sales a la sangre, ésta no se coagulaba y, por otra parte, observó que al diluir la sangre con agua, se producía la destrucción de los glóbulos, algo que no ocurría si en vez de agua añadía suero fisiológico a la dilución (1,2). A lo largo del siglo XIX, numerosos observadores describieron la presencia en la sangre de otros corpúsculos más pequeños que los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, aunque había mucha incertidumbre sobre su génesis y función. Existían diferentes hipótesis al respecto, desde su condición de productos de desintegración de los otros elementos formes, hasta su condición de elementos precursores de los eritrocitos. E incluso llegaron a ser confundidas con bacterias (1-4).

Si pensamos en una plaqueta podríamos creer que se trata de una célula normal. Nada más lejos de la realidad, puesto que las plaquetas son partículas enucleadas con rasgos celulares que derivan de los bordes de los megacariocitos de la médula ósea (5,6) en un proceso regulado por la hormona trombopoyetina. Sin embargo, en la literatura

muchas veces se sigue haciendo referencia a la plaqueta como una célula. El descubrimiento de la plaqueta se atribuye tanto al francés Alfred Donné (1801-1878) (Figura 1), como al médico inglés George Gulliver (1804-1882). El término plaqueta deriva de la palabra francesa “plaquette”, siendo Geroge Hayem uno de los primeros en emplear este término, en 1883 (7). El primer aislamiento de plaquetas data, por tanto, del siglo XIX y se debe a Giulio Bizzorero (1841-1901), que identificó la hemostasia y la trombosis como procesos análogos.



Figura 1. Alfred Donné (1801-1878)

1.1.1. FUNCIÓN PLAQUETARIA

Las plaquetas son elementos circulantes presentes en la sangre de todos los mamíferos, constituyendo el 70% del número total, ya que el 30% restante se localiza en el bazo. Las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la hemostasia, iniciando la formación de coágulos. De esta manera, podemos encontrar dos situaciones opuestas: si el número de plaquetas es demasiado bajo, se pueden desarrollar hemorragias excesivas pero, por otra parte, si el número de plaquetas es demasiado alto, se pueden llegar a formar coágulos sanguíneos con el consecuente desarrollo de trombosis. La formación de coágulos puede provocar la obstrucción de los vasos sanguíneos dando pie a un accidente cerebro-vascular, infarto agudo de miocardio, embolismo pulmonar y el bloqueo de vasos sanguíneos en cualquier otra parte del cuerpo. Cualquier anomalía o enfermedad de las plaquetas es denominada trombocitopatía, y puede deberse a un número reducido de plaquetas (trombocitopenia), a un déficit en su función (tromboastenia), o a un incremento en el número (trombocitosis). Existen desórdenes que pueden reducir el número de plaquetas, como la PTI, los cuales causan problemas hemorrágicos. Por otra parte, otros desórdenes como la trombocitopenia inducida por

la heparina, pueden causar trombosis o coágulos en lugar de hemorragia. La trombopoyetina, además de estar implicada en la generación de la plaqueta a partir del megacariocito (Figura 2), como ya se ha comentado al principio de esta tesis doctoral, también parece desempeñar un importante rol en la reversión de la trombocitopenia. En este sentido, las plaquetas están consideradas como elementos altamente especializados que juegan un papel fundamental en diferentes procesos cardiovasculares (8).

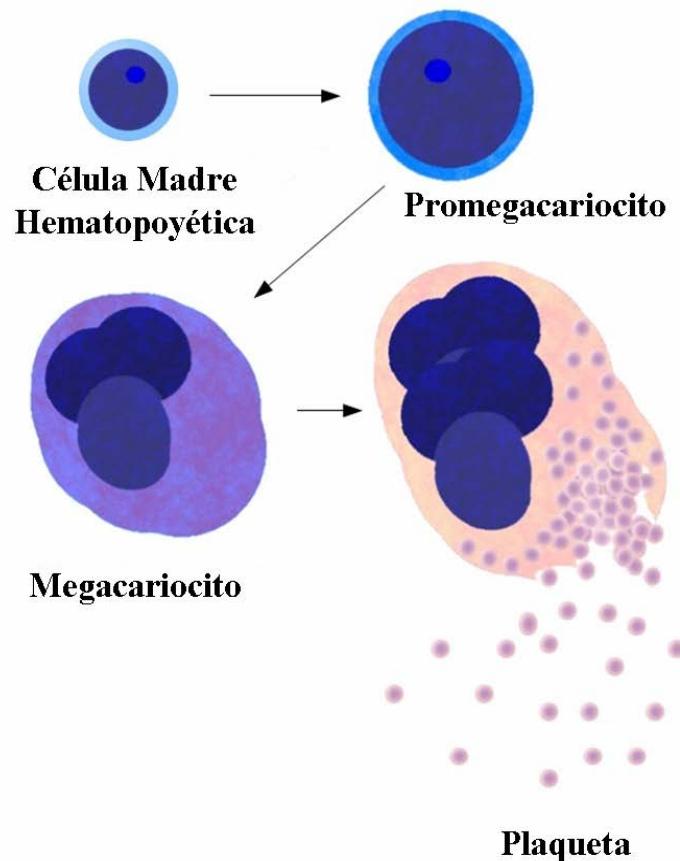


Figura 2. Formación de las plaquetas a partir del megacariocito.

Las plaquetas poseen una vida media de aproximadamente diez días, siendo su concentración normal de 150000 a 420000/ μ l. Su diámetro y grosor normal es de $3,6\pm 0,7$ μ m y $0,9\pm 0,3$ μ m, respectivamente. El VPM es de $7,06\pm 4,85$ femtolitros, aunque este VPM puede verse incrementado en caso mayor demanda de trombopoyesis, como puede ocurrir en situaciones de trombocitopenia. Por otro lado, el VPM disminuye con la edad de las plaquetas.

1.1.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN PLAQUETARIA

Desde un punto de vista estrictamente morfológico, las plaquetas son estructuras muy sencillas. Sin embargo, desde un punto de vista funcional, presentan una actividad fisiológica verdaderamente compleja. En la plaqueta pueden diferenciarse cuatro zonas mediante microscopio electrónico:

- a) *Zona periférica:* Está formada por la membrana plasmática y glicoproteínas que se encargan de desempeñar funciones específicas.
- b) *Zona gelatinosa:* Está formada por la matriz citoplasmática.
- c) *Zona de orgánulos:* Contiene diversos orgánulos, como mitocondrias, ribosomas, Aparato de Golgi y gránulos de distintos tipos, que serán descritos en apartados posteriores.
- d) *Sistema de membranas:* Es una zona formada por canalículos y túbulos densos que le dan a la plaqueta un aspecto de estructura esponjosa.

1.1.2.1. La zona periférica de la plaqueta.

Las plaquetas poseen toda una colección de proteínas de membrana que se encuentran embebidas en la bicapa lipídica. Se estima que más de la mitad de las proteínas interactúan de manera directa o indirecta con diferentes membranas celulares (9,10).

Las proteínas de la membrana plasmática de la plaqueta, al igual que las de cualquier otro tipo celular, se clasifican en integrales o periféricas (Figura 3). Las proteínas integrales están embebidas de forma permanente en la membrana y se dividen a su vez en proteínas transmembrana, que atraviesan la totalidad de la membrana, o en proteínas monotópicas, que se encuentran embebidas de forma permanente en una de las dos caras de la membrana. Paralelamente, las proteínas transmembrana se dividen en bitópicas o politópicas, según contengan uno o más dominios transmembranales, respectivamente. Todas las proteínas transmembrana poseen un dominio hidrofóbico con estructura en α -hélice o lámina- β (11). Por otro lado, las proteínas periféricas se asocian sólo de forma temporal con los lípidos de membrana o con proteínas integrales mediante interacciones hidrofóbicas, electrostáticas o no covalentes (10). Muchas de las

interacciones que experimentan las proteínas periféricas con la membrana plasmática son consecuencia de la activación celular como resultado de un cambio en la composición lipídica de la membrana o a través de una modificación post-traslacional de una proteína integral de membrana. Por ejemplo, la fosforilación en un residuo de tirosina de la proteína integral de membrana llamada adaptador LAT permite el reclutamiento de proteínas fosfolipasas citosólicas con dominios SH2, C γ 2, Grb2 y Gads a la superficie citosólica de la membrana plasmática (12). De manera similar, niveles aumentados de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) en la superficie intracelular de la membrana plasmática permite el reclutamiento de proteínas citosólicas con dominios PH, mientras que una expresión elevada de fosfatidilserina en la superficie extracelular de la membrana plasmática recluta componentes de la cascada de la coagulación (13).

Las proteínas transmembranales se clasifican en tres grupos funcionales principales: receptores, transportadores y enzimas (10).

- *Receptores:* Median las respuestas celulares por unión de un ligando. Estos receptores pueden pertenecer a cuatro superfamilias diferentes: Receptores acoplados a proteínas G, inmunoglobulinas y receptores relacionados, receptores tipo tirosina quinasa y receptores *depositarios* y relacionados.
- *Transportadores:* Mueven sustancias a través de las membranas siguiendo gradientes electroquímicos o consumiendo energía procedente de reacciones químicas. Los hay de tres tipos: canales, transportadores de solutos y transportadores activos.
- *Enzimas:* Se clasifican en oxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

El conocimiento de toda la colección de proteínas que poseen las plaquetas sobre su superficie, ya sean activadas o en reposo, se antoja interesante para comprender cómo desempeñan las plaquetas todas sus funciones bajo condiciones fisiológicas o patológicas. Entre estas proteínas de membrana, se encuentran las diferentes *glicoproteínas*, localizadas en la zona periférica de la plaqueta, como ya se ha descrito.

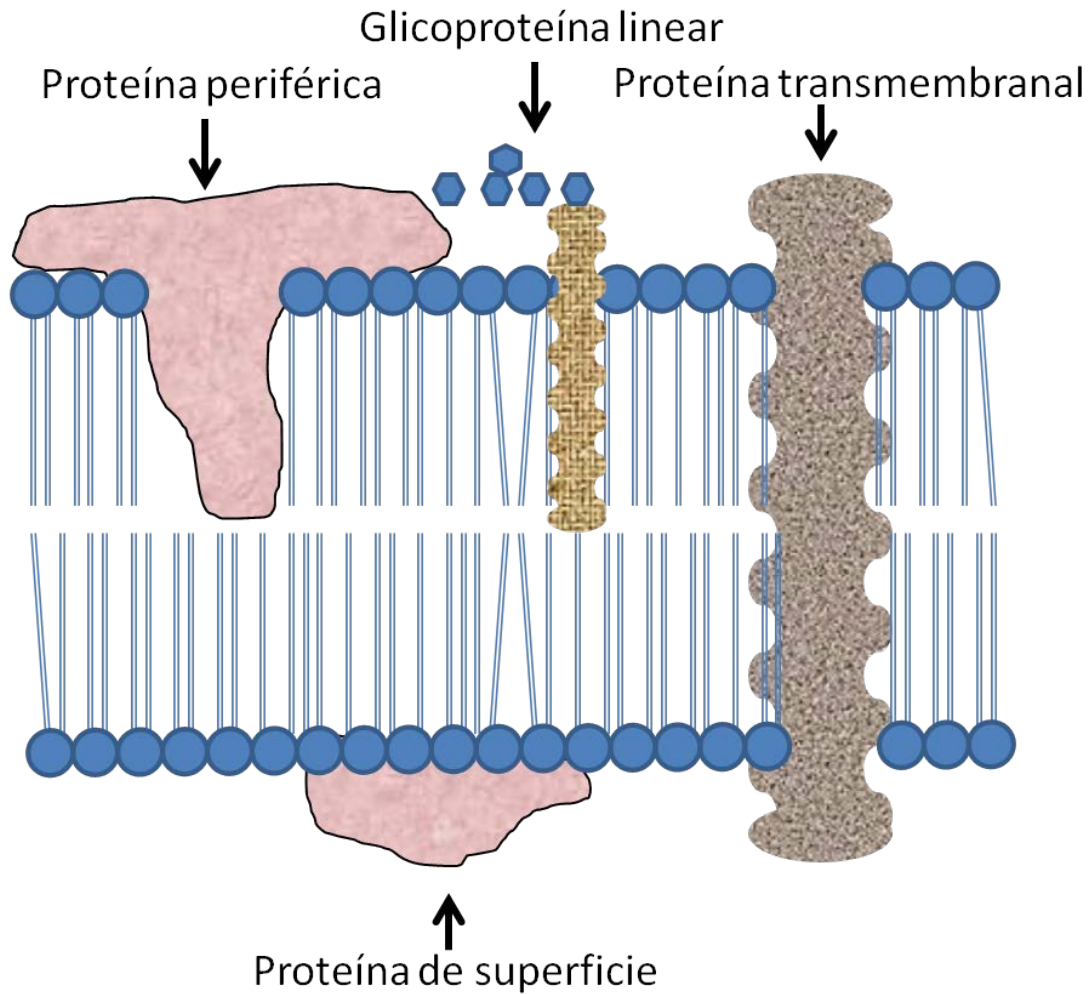


Figura 3. Proteínas de la membrana plasmática plaquetaria.

1.1.2.1.1. Glicoproteínas plaquetarias

Las glicoproteínas de membrana participan en una gran cantidad de interacciones para lograr la adhesividad entre células y funcionan como receptores de señales procedentes del exterior de la plaqueta. La recepción de estas señales en forma de ligandos específicos permite y facilita la interacción célula-célula, desencadenándose así la respuesta plaquetaria. Las glicoproteínas plaquetarias se clasifican en función de su movilidad electroforética. Existen distintas glicoproteínas plaquetarias, por lo que a continuación se describirán las que, por una razón u otra, sean más relevantes.

1.1.2.1.1.1. Glicoproteína plaquetaria IB

La GPIb está localizada en la superficie externa de la membrana plasmática, existiendo aproximadamente unas 25000 moléculas por plaqueta, y contiene cuatro

subunidades diferentes (GPIb-alfa, GPIb-beta, GPIb-IX y GPIb-V). Esta glicoproteína es la responsable de la carga negativa presente en la superficie de la plaqueta. Posteriormente describiré más a fondo el papel que desempeña esta glicoproteína.

1.1.2.1.1.2. Glicoproteína plaquetaria IIb-IIIa

La GPIIb-IIIa, dada su condición de heterodímero, se compone de dos subunidades diferentes, alfa (GPIIb) y beta (GPIIIa), ambas producto de genes distintos. Esta glicoproteína de membrana representa el 2% de las proteínas plaquetarias totales y en las plaquetas en reposo existen aproximadamente 50000-80000 complejos. El complejo IIb-IIIa funciona como receptor del fibrinógeno y del FvW sólo después de la activación de la plaqueta.

1.1.2.1.1.3. Glicoproteína plaquetaria Ia-IIa

La glicoproteína Ia-IIa es un factor fundamental en la adhesión de las plaquetas al endotelio lesionado, ya que su función es actuar como receptor de colágeno, tanto fibrilar como no fibrilar.

1.1.2.2. La zona de orgánulos

Como ya se ha mencionado, las plaquetas poseen en su interior gránulos con moléculas muy potentes (14,15), a pesar de su nula capacidad de síntesis proteica. Existen cuatro tipos de gránulos de almacenamiento en la zona de orgánulos de la plaqueta (Figura 4), a saber:

- Gránulos densos.
- Gránulos alfa
- Lisosomas
- Proteínas granulares de difícil localización.

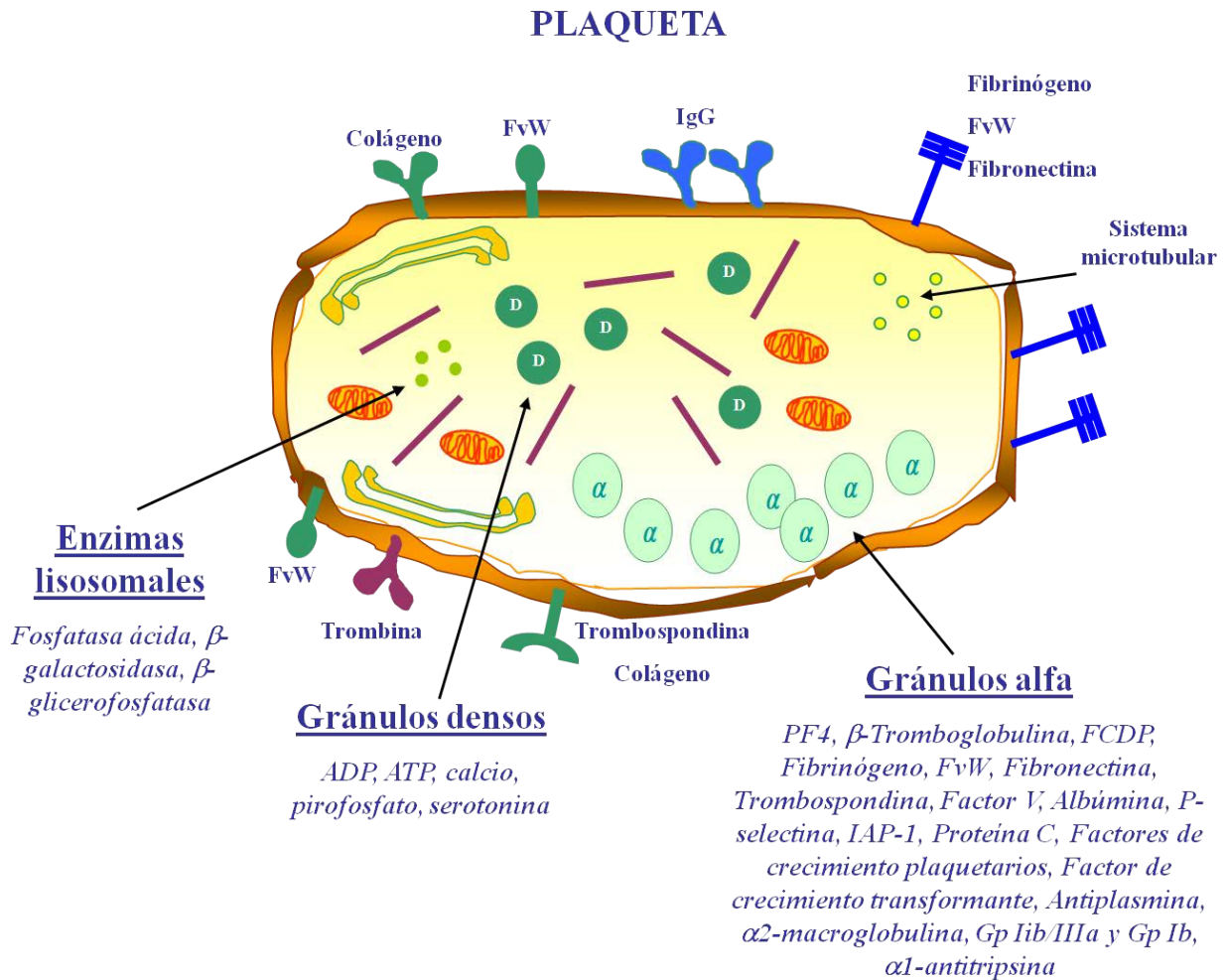


Figura 4. Contenido de los gránulos plaquetarios

1.1.2.2.1. Gránulos plaquetarios

Los *gránulos α* almacenan proteínas específicas de las plaquetas, como β-tromboglobulina y factor 4 plaquetario, además de otras que son constituyentes normales del plasma, como el fibrinógeno, la proteína S y el factor V. El FvW, localizado también en la estructura tubular de la plaqueta, es una glicoproteína de alto peso molecular, esencial en la adhesión plaquetaria, que además se encuentra en la zona periférica de estos gránulos alfa.

Los *gránulos densos* almacenan nucleótidos de adenina no intercambiables con aquellos que están implicados en el metabolismo general de la célula, en forma de ADP y ATP, y constituyendo un complejo con iones de calcio y pirofosfato. En estos gránulos densos se pueden encontrar también grandes cantidades de serotonina, la cual

tiene una acción sinérgica con otros agentes a la hora de activar las plaquetas y modular el tono y la integridad vascular (16).

Llegados a este punto resulta interesante pararse a pensar cómo se produce la secreción del contenido de los gránulos de la plaqueta. La secreción de los gránulos de las plaquetas se produce mediante la fusión del gránulo con las membranas del sistema de conexión a la superficie en un proceso que requiere de la presencia de iones calcio y de una fosfolipasa dependiente de calcio.

1.1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA PLAQUETA: MECANISMOS DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.

Las plaquetas se encargan de mantener la integridad de la vascularización en condiciones fisiológicas, evitando aumentos tanto en la fragilidad como en la permeabilidad vascular (17,18). En la hemostasia interaccionan por lo menos tres sistemas biológicos: los componentes de la pared vascular, las plaquetas y las proteínas de la cascada de coagulación sanguínea (Figura 5).

A la hora de estudiar el proceso de formación del trombo plaquetario se pueden diferenciar cuatro etapas en las que ocurren diferentes mecanismos no del todo conocidos:

- 1) Frenado de las plaquetas circulantes sobre la pared vascular contra la corriente del flujo sanguíneo que las empuja.
- 2) Activación y adhesión firme de la plaqueta a la pared del vaso.
- 3) Unión de más plaquetas a las ya adheridas, que sería la fase de crecimiento del trombo.
- 4) Estabilización del trombo.

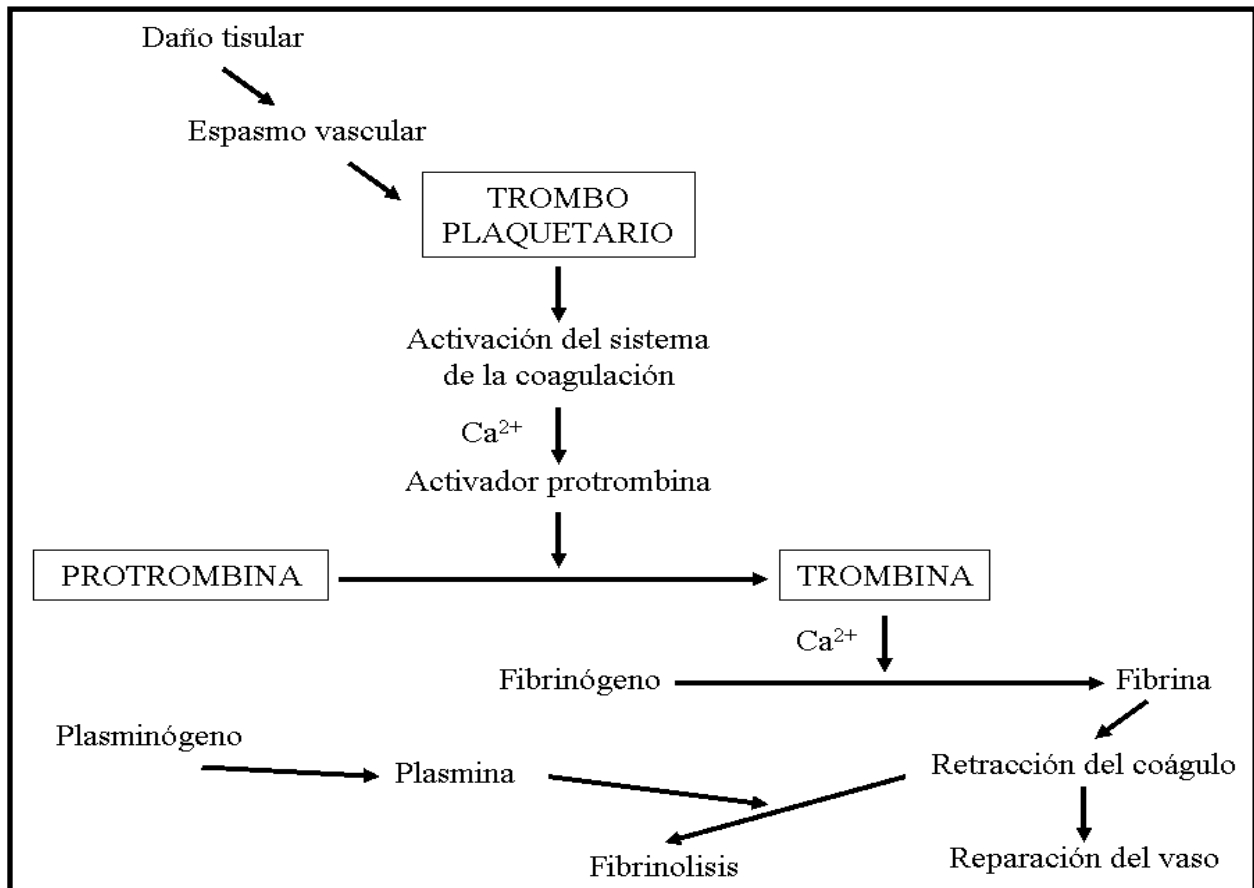


Figura 5. Formación del trombo plaquetario en respuesta a daño tisular

1.1.3.1. Adhesión plaquetaria

1.1.3.1.1. El rol de la GPIIb α , el colágeno y el FvW.

Bajo condiciones normales de circulación sanguínea, las moléculas como el NO (19) y la PGI₂ (20) liberadas desde células endoteliales sanas pueden producir inhibición de la activación plaquetaria. Sin embargo, cuando se ocasiona un daño en el endotelio, se produce una interrupción en el mecanismo inhibitorio de la activación de la plaqueta. De esta manera, la matriz subendotelial, dada su condición proinflamatoria, queda expuesta, lo que da pie a toda una serie de eventos que derivan, en primera instancia, en la adhesión de las plaquetas a la zona dañada. Por tanto, queda bien claro que la activación plaquetaria se produce cuando se desencadena una respuesta contráctil en los vasos lesionados y, al mismo tiempo, las plaquetas se adhieren a componentes subendoteliales, fundamentalmente colágeno.

En este sentido, la acumulación de plaquetas en la zona dañada o disfuncional del endotelio en la pared arterial inicia la formación del trombo (21). Posteriormente, se forman y liberan sustancias vasoactivas que favorecen el proceso de agregación plaquetaria y se pone en marcha una reacción en cascada al activarse a su vez otras plaquetas.

Como ya se ha descrito, las glicoproteínas de membrana presentes en la zona periférica de la plaqueta actúan como receptores que captan señales externas y median un amplio número de interacciones de adhesividad celular, permitiendo las interacciones entre células a través de la unión a sus ligandos específicos, algo que, en última instancia, desencadena la respuesta plaquetaria. La GPIIb/IIIa es un componente muy importante de este mecanismo, ya que participa en esta fase inicial de la activación plaquetaria permitiendo el frenado de las plaquetas. Esta glicoproteína se expresa de manera constitutiva en la membrana de la plaqueta, encargándose de iniciar el proceso de adhesión plaquetaria a través de su unión al colágeno y al FvW (22). Por otra parte, GPIIb/IIIa también actúa como principal receptor para una proteína que se encuentra en la superficie de los leucocitos activados, la proteína denominada Mac-1, y es a través la interacción entre ambas cuando se produce la unión entre la plaqueta y el leucocito, fundamental en la respuesta inflamatoria mediada por la plaqueta.

El FvW es una proteína multimérica sintetizada a partir de una forma precursora, pre-pro-FvW (Figura 6), tanto por las células endoteliales donde es almacenada en los llamados cuerpos de Weibel Palade y desde los que se libera a la circulación, como por los megacariocitos donde, como ya se ha mencionado, se almacena en los gránulos α . El FvW tiene dos funciones biológicas principales bien establecidas: Una de ellas es mediar la adhesión y agregación de las plaquetas, y la otra actuar como consorte para el factor VIII de la coagulación sanguínea. Recientemente, se han atribuido otras funciones al FvW (23,24), entre ellas:

- La angiogénesis.
- La proliferación del músculo liso.
- La metástasis de células tumorales.
- La respuesta inmunitaria.

Tanto el tamaño como la conformación del FvW se pueden ver modificados por factores genéticos y medioambientales, incluyendo la acción de la proteasa ADAMTS13 y de la glicoproteína adhesiva trombospondina-1 (TSP-1).

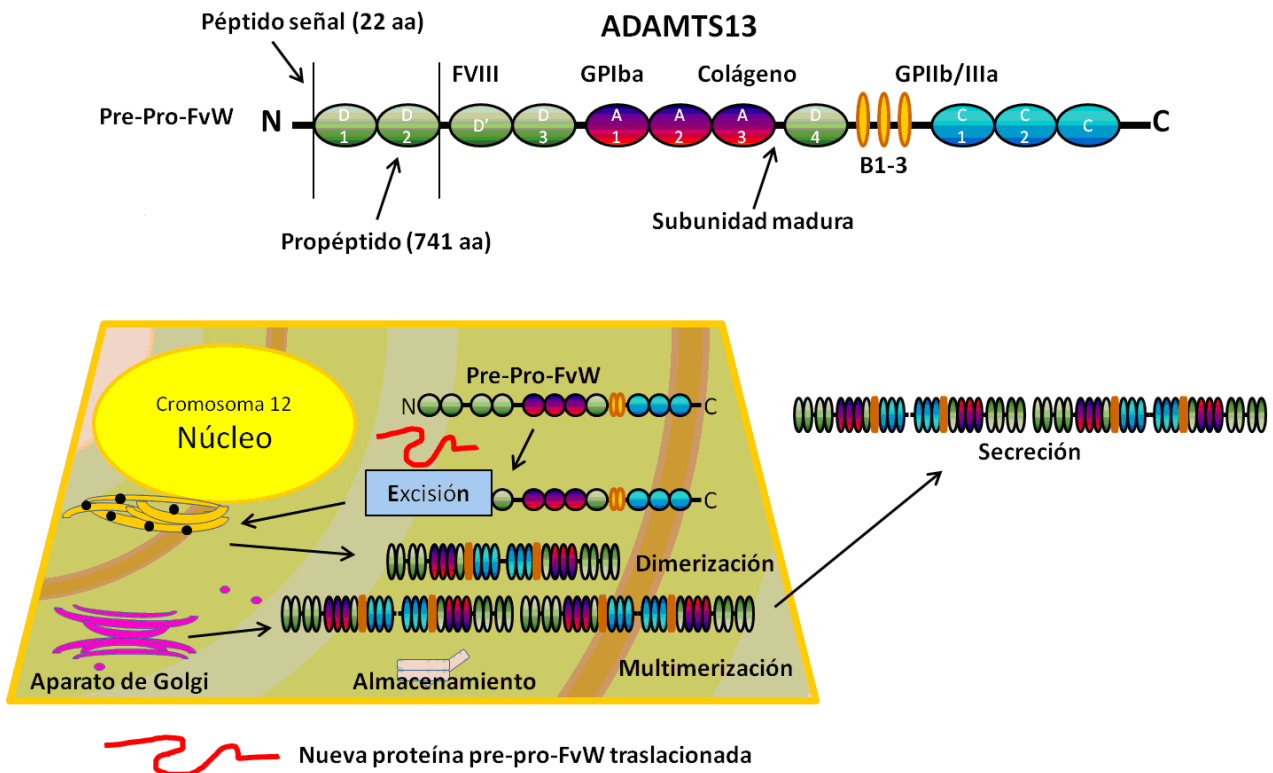


Figura 6. Síntesis del FvW

¿Cómo contribuye el FvW a la adhesión plaquetaria? El FvW se embebe en las fibras de colágeno, concretamente del colágeno de tipos I, II y VI, por lo que, en aquellos vasos en los que exista alto estrés de rozamiento, el FvW va a ser fundamental para disminuir el flujo rápido de las plaquetas a través de la interacción de su dominio A1 con GPIIb α . En este sentido, las proteínas localizadas en la pared vascular, y fundamentalmente el colágeno, inducen la activación de las plaquetas y su adhesión a la pared, con el fin de que el colágeno y el FvW formen una especie de unidad funcional para la generación inicial del trombo. Esta unión inicial es transitoria e inestable, pero es suficiente para reducir la velocidad del tránsito de plaquetas y el FvW contribuye a dicha captación inicial de plaquetas sobre la superficie del vaso. Gracias al colágeno, se permite la consolidación de una unión más estable con las plaquetas y se puede concluir

que es precisamente esa interacción transitoria entre el FvW y la GPIIb α la que va a permitir la "rodadura" de las plaquetas por la zona dañada del vaso.

1.1.3.1.2. La integrina α IIb β 3.

El receptor más abundante en la plaqueta es otra glicoproteína, la integrina α IIb β 3 (GPIIb/IIIa), de la que existen aproximadamente 50.000-80.000 unidades en la superficie de cada plaqueta. En este receptor heterodimérico las subunidades GPIIb y GPIIIa se unen mediante unión no covalente (25). A pesar de que la mayoría de las GPIIb/IIIa se encuentran en la superficie plaquetaria, existe sólo una pequeña parte almacenada en los gránulos α y en el sistema canalicular de la plaqueta, el cual se conecta a la membrana externa de la misma. La GPIIb/IIIa desempeña una función muy importante en la adhesión de la plaqueta a la pared vascular.

1.1.3.2. Activación plaquetaria

Tras producirse la adhesión transitoria de las plaquetas, su activación ocurre en dos rápidas fases que se amplifican mediante un mecanismo de retroalimentación positivo y concluyen en una agregación irreversible:

- **Fase 1:** Esta primera fase se inicia por unión del colágeno a GPVI, induciéndose la rápida activación de una casacada de proteínas quinasas. Esta cascada da lugar a numerosos eventos de señalización que permiten el cambio de forma de la plaqueta y la secreción de numerosos factores de retroalimentación positiva.
- **Fase 2:** La segunda fase consiste en una activación "corriente abajo" de estos y otros factores, reclutándose más plaquetas y produciéndose la agregación de las mismas (26-31).

1.1.3.2.1. GPVI e integrina α 2 β 114.

Durante la interacción de la plaqueta con el colágeno actúan dos receptores plaquetarios. Uno de ellos se acaba de mencionar y participa en la Fase 1 de la activación plaquetaria, GPVI, y el otro es la integrina α 2 β 114.

GPVI es un receptor activador específico de la plaqueta. La vía de señalización de GPVI ha sido objeto de numerosas investigaciones descritas en la literatura científica (31-34). Se ha descrito que las plaquetas deficientes en GPVI no son capaces de agregarse en presencia de colágeno. Cuando GPVI se une al colágeno provoca la formación de un racimo de receptores, seguida de la fosforilación de la cadena γ del receptor Fc (FcR) que está asociado mediante unión no covalente. Existen dos residuos de tirosina altamente conservados localizados dentro del motivo inmunoreceptor activador basado en tirosina (ITAM) de la cadena γ del receptor Fc que son fosforilados por quinasas de la familia Src, concretamente Fyn y Lyn (35). Fyn y Lyn permiten el acoplamiento de la tirosina quinasa Syk a través de dos dominios de homología Src 2 (SH2), lo que desencadena la ya mencionada cascada de quinasas (27-30). Syk se autofosforila en numerosos residuos de tirosina e induce la fosforilación de residuos de tirosina presentes en la proteína enlazadora para la activación de células T (LAT) (36-38). LAT actúa como un sistema de andamiaje para moléculas de señalización como la fosfolipasa $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). PLC $\gamma 2$ cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-difosfato a inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol, disparando un aumento en los niveles de calcio intracelular. La concentración aumentada de calcio desencadena la secreción de gránulos α y gránulos densos (31-33). Como ya se ha descrito previamente, los gránulos α y los gránulos densos contienen fibrinógeno, FvW, factores de coagulación V y XIII, ADP y serotonina. Dichos gránulos actúan de forma autocrina y paracrina para estimular las plaquetas (31,38-42).

Por otra parte, PI3K cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5-difosfato a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Este lípido fosforilado recluta proteínas dependientes de quinasas y proteína quinasa B (PKB), también conocida como Akt, siendo activadas para inducir la señalización que terminará produciendo un aumento en la afinidad del receptor de fibrinógeno, la integrina $\alpha I I b \beta 3$ (36, 42,43-47).

En última instancia, la activación de las plaquetas mediada por GPVI concluye con una firme adhesión de las plaquetas y la secreción de las sustancias procoagulantes y proinflamatorias que contienen, lo que hace que el trombo crezca y se consolide su formación.

Los factores secretados por las plaquetas actúan ejerciendo un mecanismo de señalización que se retroalimenta positivamente para atraer más plaquetas que permitan

el crecimiento del trombo. En este sentido, la agregación plaquetaria es un proceso de reclutamiento de nuevas plaquetas que sigue al depósito previo de otras plaquetas sobre el FvW y el colágeno. Aquí tiene cabida una sencilla pregunta: ¿Cómo es posible? Es posible gracias a la acumulación local de agonistas de la activación de las plaquetas debida a su secreción desde las plaquetas ya adheridas a la pared del vaso. Estos agonistas son, entre otros, el ADP, el TxA₂, adrenalina y trombina, cada uno de los cuales se une a receptores específicos en la superficie de la membrana plasmática plaquetaria. El TxA₂ liberado se une a receptores de prostaglandina-tromboxano, contribuyendo a la activación plaquetaria por retroalimentación positiva (48,49). Estos agonistas y sus receptores acoplados (50) serán explicados con detalle en el apartado 1.1.4 de esta tesis doctoral, en el que se tratan los mecanismos de interacción plaqueta-plaqueta.

1.1.3.3. Agregación plaquetaria. La propagación del trombo

En la etapa final se produce la activación de receptores α IIb β 3 que posibilitan la unión del fibrinógeno y también del FvW, lo que permite el establecimiento de puentes estables entre las plaquetas. Muchas vías independientes de señalización, como aquellas estimuladas por colágeno, trombina, ADP, y tromboxano A₂, aumentan la afinidad de α IIb β 3 por su ligando a través de un proceso denominado *señalización dentro-fuera* (26). La elevada afinidad de α IIb β 3 media la interacción plaqueta-plaqueta a través de la interacción bivalente con fibrinógeno o con FvW, formando un agregado. Además de mantener juntas a las plaquetas, la unión del receptor con su ligando produce la señalización “dentro-fuera”, lo que desencadena la amplificación de la activación plaquetaria (51,52). La señalización “dentro-fuera” permite que se produzca la remodelación del citoesqueleto de actina de la plaqueta, lo que se traduce en el consecuente cambio de forma de la misma junto con la formación de filopodios, lamelipodios y, en última instancia, la extensión de la plaqueta (52,53). Los mecanismos de señalización relacionados con la retracción del coágulo, la estabilización del trombo y la reparación de la herida reciben una atención especial que queda recogida en la literatura.

1.1.3.3.1. CD40L

En el proceso de estabilización del trombo participan también otras moléculas, siendo CD40L una de las más destacadas e importantes en dicho proceso. CD40L es una glicoproteína que se almacena en los gránulos plaquetarios que se empieza a expresar en la superficie plaquetaria una vez ha ocurrido la desgranulación. El receptor para CD40L, tanto el soluble como el que está unido a la superficie de la plaqueta, es CD40. Esta molécula se expresa, entre otros tipos celulares, en linfocitos B, neutrófilos, monocitos, otras plaquetas, células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos y células de músculo liso vascular. Pese a que el rol que desempeña esta interacción CD40L-CD40 no es del todo bien conocido, sí se sabe por otro lado que la interacción de CD40L presente en la plaqueta con el CD40 localizado en células endoteliales es capaz de estimular la expresión y liberación de moléculas inflamatorias (54). Por otra parte, la cuando el CD40L expresado en las plaquetas interacciona con las células endoteliales de origen coronario se produce una disminución en la capacidad que tienen estas células de liberar NO, hecho que en consecuencia aumenta el estrés oxidativo (55).

1.1.4. MECANISMOS DE INTERACCIÓN PLAQUETA-PLAQUETA.

La activación plaquetaria inicial tiene que transmitirse al mayor número posible de plaquetas. Esta transmisión se logra a través de diferentes mecanismos cooperativos que dan pie al fenómeno denominado *reclutamiento plaquetario*. En este sentido, el término “agregación” se refiere a la unión o interacción de una plaqueta con otra. Este proceso se produce por el estímulo generado por agonistas, siendo los más importantes el ADP, la adrenalina, la trombina y el colágeno (Figura 7).

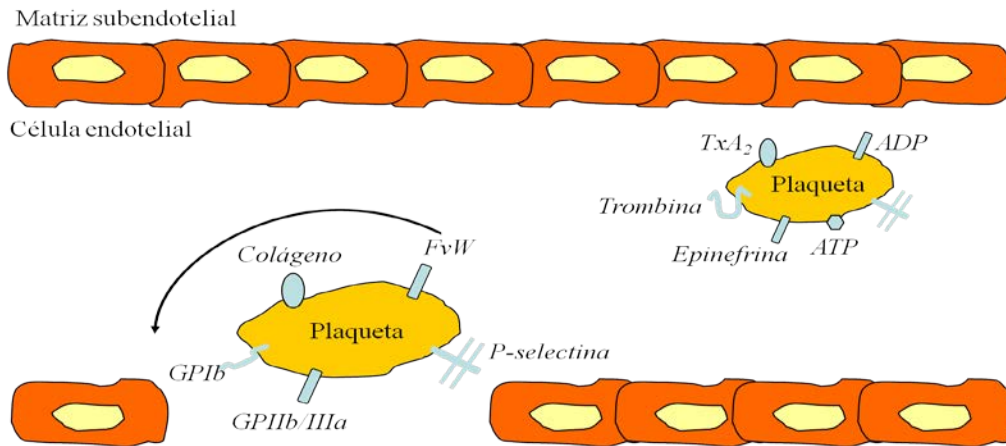


Figura 7. Principales agonistas y proteínas de adhesión que en la plaqueta participan en el proceso de activación plaquetaria: ADP, ATP, FvW, GPIb, GPIIb/IIIa, TxA₂.

1.1.4.1. El TxA₂ y su función como amplificador de la activación plaquetaria.

El TxA₂ es un importante factor de cooperación que se sintetiza en la plaqueta (56). El ácido araquidónico es el sustrato de la COX-1, siendo esta una enzima que produce endoperóxidos cíclicos de las prostaglandinas, PGG₂ y PGH₂, como productos iniciales a partir del dicho ácido araquidónico. A su vez, y a continuación, PGG₂ y PGH₂ se convierten en TxA₂ por acción de otra enzima, la TxA₂ sintasa (57). Por otra parte, el TxA₂ también tiene la capacidad de activar más plaquetas y de contraer las células del músculo liso vascular al ser liberado por las plaquetas activadas. Por ende, el TxA₂ potencia la agregación plaquetaria mediante la hidrólisis del fosfoinosítido y elevación del calcio citosólico. Sin embargo, el modo de actuación del TxA₂ no contempla la penetración de éste en las células sino que interacciona con receptores específicos de superficie (Figura 8). Existen datos que dan a entender que la movilización de calcio por acción del TxA₂ implica una inhibición de la adenilato ciclasa y un descenso de AMPc plaquetario. Hay que señalar como dato importante que la agregación plaquetaria inducida por el TxA₂ es irreversible. Además, el TxA₂ tiene también un potente efecto vasoconstrictor (58), lo que condiciona la aparición de cambios en el flujo sanguíneo que potencian la adhesión plaquetaria y aumentan el estrés de rozamiento. En las plaquetas y la pared vascular se expresan diferentes subtipos del receptor de TxA₂ (59,60).

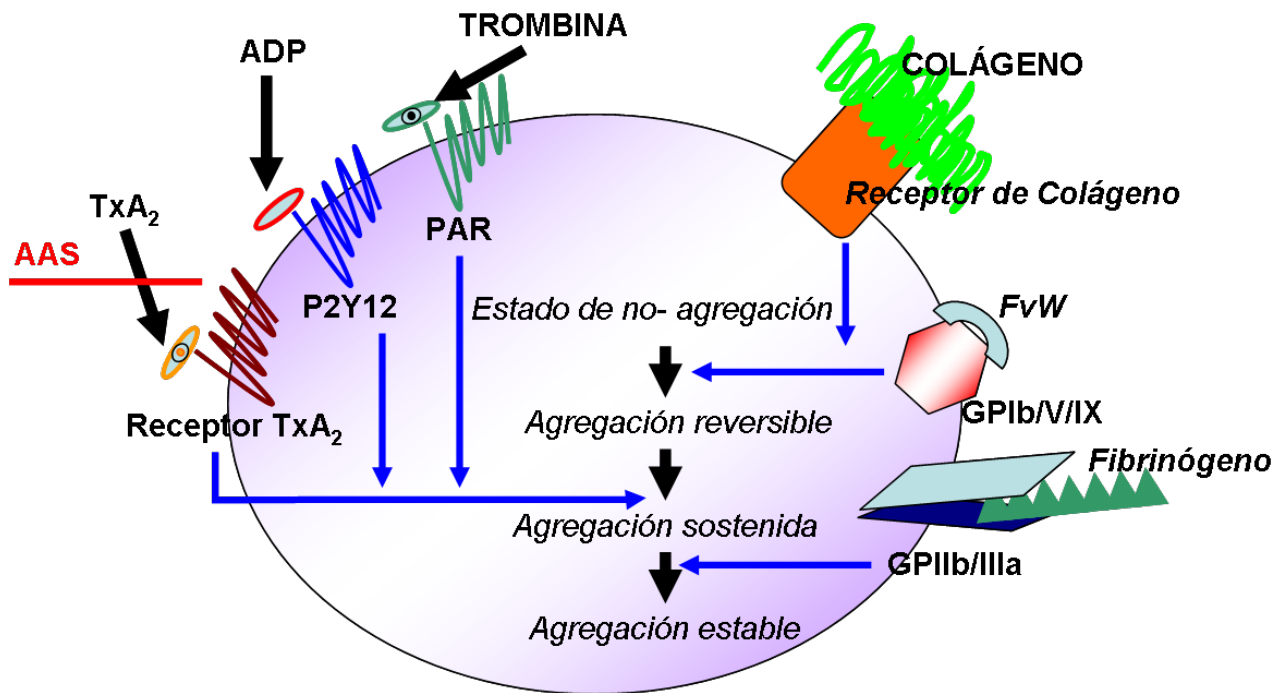


Figura 8. Interacción de TxA₂ con la plaqueta.

1.1.4.2. El ADP como agonista de la activación plaquetaria.

La propagación de la activación plaquetaria también se debe a la participación del ADP en el proceso. Esta molécula, además de ser liberada desde los gránulos densos de las plaquetas, también se libera por las células endoteliales y por los eritrocitos. El ADP ejerce su acción a través de su unión a los receptores P2Y₁₂, inhibiendo la adenilato ciclasa para reducir la formación de AMPc en la plaqueta, lo que facilita su activación. Además, gracias a la unión del ADP a receptores P2Y₁, produce la activación de la fosfolipasa C. Los dos receptores a los que se une la molécula de ADP, P2Y₁₂ y P2Y₁, están acoplados a proteínas G_q y G_i, respectivamente. Este acoplamiento con proteínas G tiene gran importancia sobre el efecto que el ADP produce en las plaquetas ya que, por ejemplo, el receptor G_q es el responsable del cambio brusco de forma que se produce en la plaqueta. Este cambio de forma que se produce en la plaqueta es dependiente del reordenamiento de los filamentos de actina en la plaqueta acoplados a la activación de los receptores P2Y₁ (61), lo que supone el paso de una primigenia forma discoidal a una forma esferoide y espinosa con filópodos largos y especulados (Figura 9). La formación de pseudópodos es el resultado de una actividad contráctil parecida a la existente en las células musculares y requiere aporte de energía. Alrededor del 20% de la proteína plaquetaria es actina. En las plaquetas en

reposito el 40-50% de la actina es actina F (filamentosa), mientras que el resto es actina G (monomérica). Tras la activación, la actina F aumenta hasta el 70-80% con el correspondiente descenso de la actina G. Esta polimerización está controlada por la profilina plaquetaria. Así mismo, a medida que la actina G se transforma en actina F se incorporan troponina y tropomiosina.

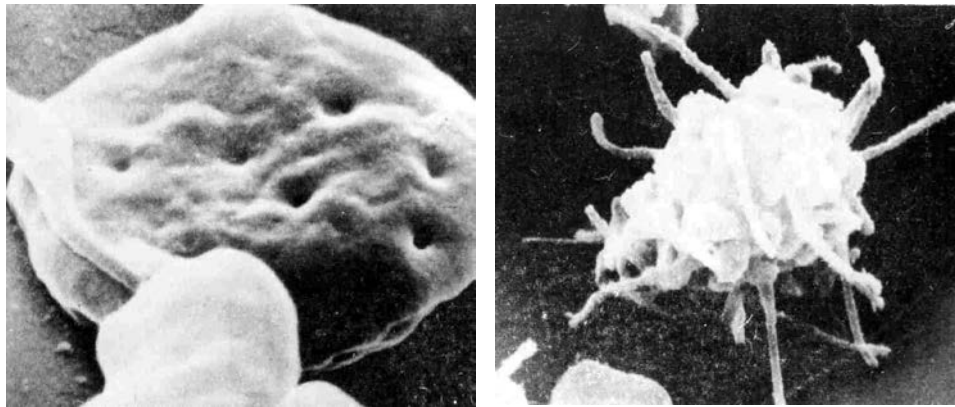


Figura 9. Cambio de forma de la plaqueta.

1.1.4.3. La función de la integrina GPIIb/IIIa en el mecanismo de agregación plaquetaria.

Anteriormente hemos visto que la integrina GPIIb/IIIa está fuertemente implicada en la activación plaquetaria, ya que participa en la adhesión de la plaqueta a la pared vascular. Sin embargo, es obligado señalar su participación en la agregación plaquetaria. Mediante la interacción de dos GPIIb/IIIa localizadas en plaquetas diferentes se produce la unión de las mismas entre sí a través del ligando principal del heterodímero, el fibrinógeno, que actúa como nexo. No obstante, otras moléculas como la fibronectina, la vitronectina y el FvW se unen también a la GPIIb/IIIa (25) a través de una región específica que todas estas moléculas poseen, la llamada región RGD (arginina, glicina, ácido aspártico) (62). La GPIIb/IIIa reconoce otras secuencias peptídicas, por ejemplo la región lisina-glutamina-alanina-glicina-aspartato-valina que, a diferencia de la RGD, sólo se ha encontrado en la molécula de fibrinógeno. De esta manera, la acumulación de plaquetas desencadenada por estos mecanismos da lugar a un conglomerado plaquetario de tamaño creciente que continúa reclutando más y más plaquetas a medida que éstas llegan al lugar lesionado. Al final se termina produciendo la oclusión completa del vaso lesionado, hecho que resulta beneficioso desde el punto de vista hemostático.

En los primeros estadios de la activación de las plaquetas el cambio de forma plaquetario es reversible pero después una serie de fuertes estímulos hacen que los orgánulos se centralicen para dar pie posteriormente a la desgranulación y liberación del contenido de los gránulos plaquetarios. De esta manera, el cambio de morfología que se produce se vuelve irreversible y se produce la consecuente agregación plaquetaria. La secreción de los gránulos contenidos en el interior de la plaqueta se da gracias a la fusión de los gránulos con la membrana plasmática y siempre en presencia de calcio. En este sentido, los microtúbulos organizan un anillo denso alrededor de los orgánulos que liberan su contenido a los canales del sistema de conexión a la superficie (63). Como ya se ha mencionado con anterioridad, los gránulos densos liberan, ADP, siendo éste un potente agregante plaquetario, ATP y serotonina. A su vez, los gránulos alfa liberan factor plaquetario 3, beta-tromboglobulina y factor mitógeno, los cuales se encargan de favorecer la agregación plaquetaria.

1.1.4.4. El papel de la trombina y sus receptores.

La trombina es el agonista plaquetario más potente. Facilita la producción de fibrina desde el fibrinógeno y se une a receptores específicos, los PAR. Cuando la trombina se une a su receptor, se produce en este último una liberación proteolítica que desencadena la activación de cuatro tipos distintos de proteínas G que dan lugar a diferentes señales en la célula. De los cuatro tipos de PAR que se han descrito hasta la fecha, en la plaqueta se expresan solamente dos, PAR-1 y PAR-4 (Figura 10). Cualquiera de estos dos receptores puede estimular la agregación y secreción plaquetarias (64,65).

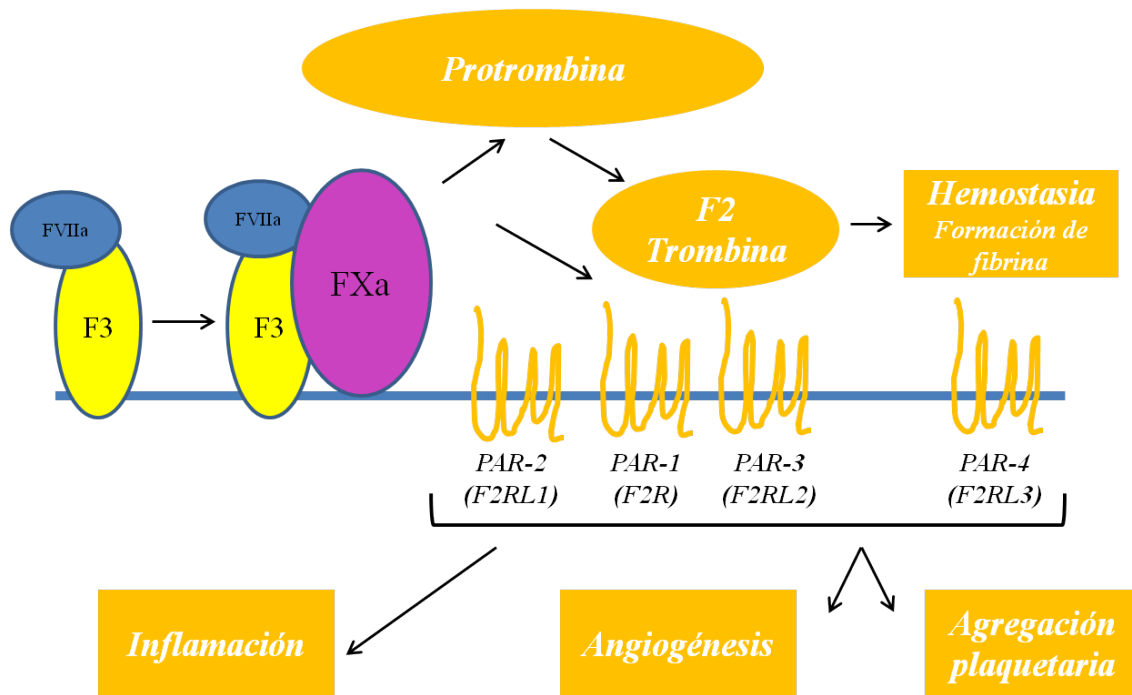


Figura 10. Los receptores PAR-1 y PAR-4 se expresan en la plaqueta y median la agregación plaquetaria.

1.1.5. INTERACCIÓN DE LA PLAQUETA CON EL ENDOTELIO Y OTRAS CÉLULAS DEL MICROENTORNO VASCULAR.

Existen diferentes tipos de células del microentorno vascular como los neutrófilos y las células endoteliales, junto con distintas hormonas vasoactivas del tipo de la adrenalina, vasopresina y endotelina, y otros factores procoagulantes como el PAF, que participan en la interacción con la plaqueta. Las plaquetas poseen efectos proinflamatorios al interactuar con los neutrófilos a través del metabolismo transcelular (66).

En este proceso, gracias a su interacción con los neutrófilos, el endotelio desempeña una función moduladora (67). Simultáneamente, el endotelio puede interactuar con las células de la sangre para así impedir la agregación plaquetaria, modulando de este modo tanto la quimiotaxis como la adherencia de los neutrófilos. En este sentido, se precisa la expresión de integrinas en la superficie de los dos tipos celulares (68).

Existe además toda una cascada de estímulos procedentes de la inmensa variedad de células del microentorno vascular que debe sumarse a la reacción de liberación de las plaquetas activadas. Por otra parte, todo el proceso se ve condicionado por la activación del sistema de la coagulación (trombina) y la presencia de hormonas vasoactivas circulantes (adrenalina, vasopresina), neutrófilos activados y macrófagos. Por ende, esta interrelación entre elementos de diferente origen conduce en última instancia a la agregación plaquetaria y a la formación de un trombo que ocluirá luz vascular (69). En este sentido, en la actualidad se considera que todas estas interacciones son multicelulares. Este hecho se traduce en que la trombogénesis no solo se va a deber al sistema de la coagulación sanguínea y las plaquetas, sino que existen otros elementos celulares del microentorno vascular implicados que participan de activamente en la misma, a saber: células endoteliales, eritrocitos y neutrófilos.

1.1.6. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y LA PLAQUETA

En la mayoría de los casos, el desarrollo de un trombo rico en plaquetas en una placa aterosclerótica es la causa subsiguiente de episodios cardiovasculares agudos, incluyendo enfermedad coronaria (infarto de miocardio) y choque isquémico. La aterosclerosis es una enfermedad crónica muy compleja fuertemente unida con dislipemia, hipercolesterolemia e inflamación. Es una enfermedad que requiere décadas para ir en progresión desde el inicio de la formación de la placa aterosclerótica. Las placas vulnerables pueden sufrir una rotura que desencadene el taponamiento de los vasos sanguíneos. Las plaquetas pueden ser factores importantes en el inicio, progresión y resultado de la enfermedad.

1.2. TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO: ASPIRINA

1.2.1. HISTORIA DE ASPIRINA

La corteza del sauce blanco (*Salix alba*) se ha empleado desde tiempos inmemoriales para aliviar la fiebre y el dolor. Este uso se remonta incluso a los tiempos de Hipócrates, que vivió 460 años antes de Cristo, o de ciertos pueblos hispanorromanos. Posteriormente, otros autores antiguos como el naturalista Plinio el

Viejo, el médico y farmacéutico Dioscórides o el célebre médico Galeno (Figura 11), siguieron haciendo referencia a los efectos medicinales del sauce blanco.



Figura 11. El célebre médico Galeno.

En la época moderna post-renacentista, el reverendo de la Iglesia de Inglaterra, Edward Stone, presentó en 1763 un informe a la Real Sociedad de Ciencia Inglesa en el que trataba las propiedades de la corteza de sauce blanco destacando especialmente el efecto antipirético que poseía (70). En su informe, Stone describía que había administrado el extracto en forma de infusión o cerveza a unos 50 pacientes enfermos en los que, posteriormente, había aliviado su fiebre (71,72). Años más tarde, concretamente en 1828, Johann Buchner, profesor de Farmacia en la Universidad de Munich, consiguió obtener a partir de la corteza de sauce una sustancia de sabor amargo y color amarillento en forma de pequeñas agujas cristalinas. Había aislado pues el principio activo de la corteza, al que bautizó con el nombre de *salicina*. Dos años antes de este descubrimiento, los italianos Brugnatelli y Fontana habían aislado ese mismo extracto pero la sustancia que habían obtenido era tan sumamente impura que les fue imposible demostrar los efectos farmacológicos de la corteza de sauce. En 1829, un farmacéutico francés, Henri Leroux, mejoró el método de aislamiento de la salicina obteniendo 30 gramos de principio activo por cada 1,5 kilogramos de corteza. Más tarde, Raffaele Piria, un químico italiano que trabajaba en la Sorbona de París, obtuvo ácido salicílico en estado puro tras la hidrólisis y oxidación del salicilaldehído obtenido de la escisión de la salicina en este compuesto aromático y en un azúcar. En 1853, el

químico francés Charles Frederic Gerhardt neutralizó el ácido salicílico con sodio y acetilclorhídrico formando ácido acetilsalicílico, aunque terminó abandonando su descubrimiento. En 1897, fue el químico alemán Felix Hoffmann (Figura 12), que trabajaba para la compañía alemana Bayer, el que redescubrió la fórmula de Gerhardt para aislar ácido acetilsalicílico, administrándosela después a su padre para tratar sus dolores artríticos. En 1949, Arthur Eichengrün, jefe directo de Hoffmann, publicó un artículo reivindicando el descubrimiento, aunque los historiadores científicos ignoraron este hecho hasta 1999, cuando las investigaciones de Walter Sneader, de la Universidad de Strathclyde, Glasgow, concluyen que efectivamente es Eichengrün quien tuvo la idea de sintetizar el ácido acetilsalicílico. Finalmente, Aspirina fue el nombre comercial con el que los laboratorios Bayer bautizaron esta sustancia (73), pasando a ser el primer fármaco del grupo de los antiinflamatorios no esteroideos, AINEs. Corría el año 1971 y el farmacólogo británico John Robert Vane, empleado por aquel entonces del Colegio Real de Cirujanos de Londres, pudo demostrar que la aspirina suprime la producción de prostaglandinas y tromboxanos. Este descubrimiento por parte de Vane fue el que abrió la posibilidad del uso de bajas dosis de aspirina para ser empleada como antiagregante plaquetario, lo que ampliaría copiosamente su campo comercial. Finalizada la primera Guerra Mundial, la marca "Aspirina" fue expropiada en los países vencedores, fundamentalmente Inglaterra, Estados Unidos y Francia, de forma que el nombre genérico de la aspirina pasó a ser "aspirin". A día de hoy, la aspirina es uno de los fármacos más ampliamente utilizados usados en todo el mundo, con un consumo estimado de 40.000 toneladas métricas anuales.



Figura 12. El Felix Hoffman.

1.2.2. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMICA DE LA ASPIRINA

1.2.2.1. Vías de administración

La vía principal de administración del ácido acetilsalicílico es la vía oral, pese a que también puede ser administrado por vía intravenosa o incluso rectal. Los comprimidos de aspirina administrados por vía oral son fácilmente hidrolizables al exponerse al agua o a aire húmedo, lo que condiciona su almacenamiento, ya que es necesario que permanezcan envueltos y protegidos hasta que sean administrados.

1.2.2.2. Absorción

La aspirina se absorbe de manera rápida en el tracto digestivo a la altura del duodeno y en la parte superior del intestino delgado. Pasadas 1-2 horas desde la ingesta de aspirina se produce un pico de máxima concentración en plasma. Sin embargo, puesto que la aspirina tiene muy baja solubilidad a pH bajo, siendo este el entorno con el que se encuentra el fármaco en el estómago, bajo condiciones de sobredosis se puede retardar la absorción del medicamento de 8 a 24 horas.

1.2.2.3. Distribución

El ácido acetilsalicílico se une en forma de salicilato a proteínas plasmáticas en un porcentaje que supera el 99% y presenta una amplia distribución tisular, siendo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y placentaria. La aspirina tiene una vida media en suero de unos 15 minutos, aproximadamente.

1.2.2.4. Mecanismo de acción de la aspirina

En los mecanismos biológicos para la producción de inflamación, dolor o fiebre, intervienen las prostaglandinas que se generan en la zona de la lesión, las cuales actúan como mensajeros del dolor, informando al sistema nervioso central de la agresión. Como ya se ha mencionado en esta tesis, el farmacólogo John Robert Vane demostró en 1971 que el ácido acetilsalicílico actuaba bloqueando los mecanismos de generación de prostaglandinas y tromboxanos (74,75), lo que restablecía la temperatura y reducía el dolor. Ya hemos descrito previamente que el TxA_2 se sintetiza y libera por las plaquetas activadas a partir del ácido araquidónico en respuesta a una amplia variedad de

estímulos aumentando la capacidad agregante plaquetaria de estos últimos, hecho que convierte al TxA_2 en un amplificador de la respuesta plaquetaria a agentes protrombóticos como el ADP, la epinefrina o el colágeno potenciando su efecto agregante.

La capacidad que tiene la aspirina para bloquear la producción de prostaglandinas y tromboxanos es debida a la inactivación de una enzima necesaria para la síntesis de estas moléculas proinflamatorias anteriormente mencionadas, la COX. Existen dos isoformas diferentes: COX-1 y COX-2 (Figura 13). La isoforma COX-1 se expresa constitutivamente, lo que significa que existen unos niveles basales en las diferentes células en las que se encuentra, incluidas las plaquetas (76,77). Por el contrario, la isoforma COX-2 no se expresa bajo condiciones fisiológicas sino que se induce rápidamente como consecuencia de un estímulo inflamatorio, lo que favorece así la potenciación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria con la producción de prostaglandinas (78).

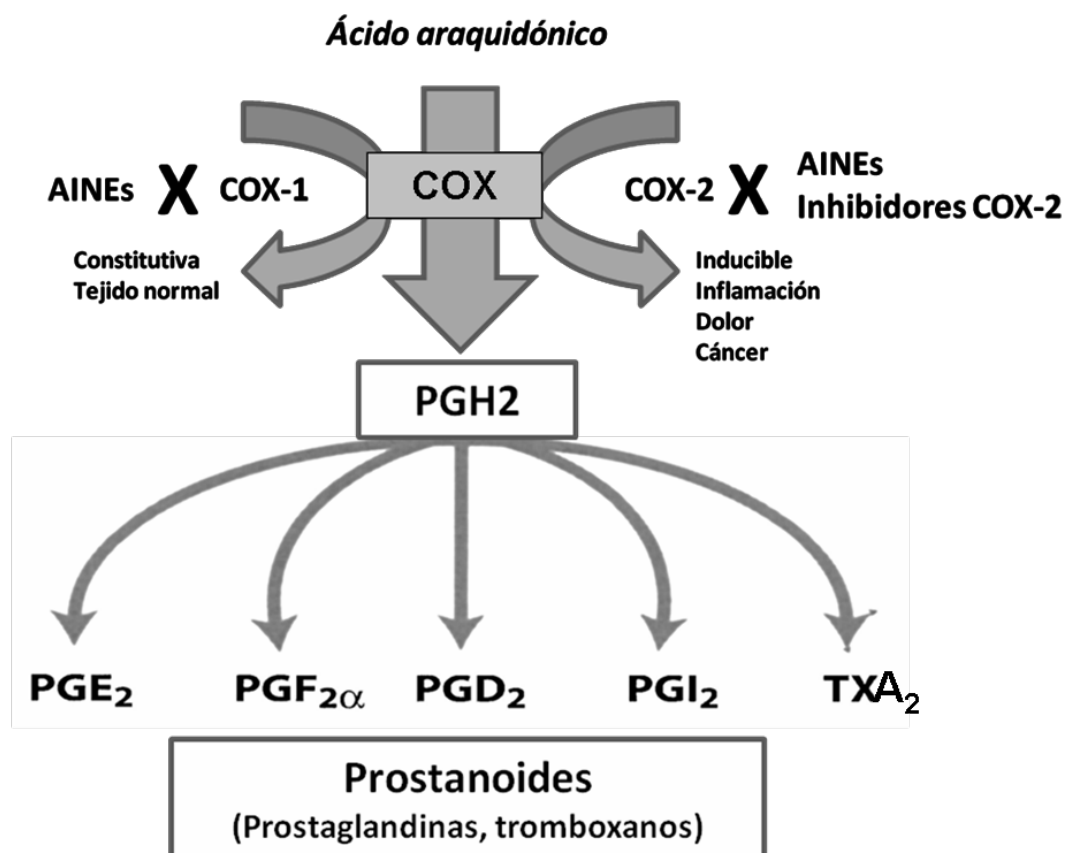


Figura 13. Formación de prostanoides.

Pero, ¿dónde actúa exactamente la aspirina sobre la proteína COX? La acción de la aspirina produce una acetilación selectiva en el grupo hidroxilo de un residuo de serina en posición 529 de la cadena polipeptídica de la COX-1 de las plaquetas provocando la pérdida de su actividad de manera irreversible (79,80). Por otra parte, hay que señalar que la aspirina acetila el residuo de serina 516 por lo que también inhibe la actividad de la isoenzima COX-2 aunque con una potencia del orden de 170 veces menor.

1.2.2.5. Efecto antiagregante plaquetario de aspirina

A pesar de que inicialmente se recomienda una dosis de aspirina de 160 mg para bloquear completamente la COX-1 de la plaqueta, dosis menores del fármaco, del orden de 81 mg diarios, producen una leve prolongación en el tiempo de sangrado, que se duplica si la administración de aspirina continúa durante una semana. El cambio se debe a la ya mencionada inhibición irreversible de la enzima COX de las plaquetas, por lo que se mantiene durante toda la vida de las mismas (entre 8 y 10 días). La propiedad antiagregante que posee la aspirina hace que ésta sea útil en la reducción de la incidencia de infartos en algunos pacientes. En este sentido, la dosis suficiente para producir la inhibición de una proporción adecuada de tromboxano es de 40 mg diarios.

Como ya hemos indicado, el principal mecanismo por el que la aspirina previene el desarrollo de un trombo plaquetario se produce a través de la inhibición de la formación de TxA_2 por las plaquetas aunque, no obstante, existen diferentes datos recogidos en la literatura con los que se sugiere que la aspirina ejerce su efecto antiagregante plaquetario no sólo mediante su acción sobre la formación de TxA_2 por las plaquetas (81). En este sentido, conviene recordar que durante el proceso de generación de un trombo en la pared vascular se origina una disrupción o falta de funcionalidad del endotelio que implica la activación de otras plaquetas circulantes y su posterior adhesión a la zona del daño producido en el endotelio, liberando entonces una serie de agentes como histamina, serotonina, ADP o el mismo TxA_2 . Estos agentes activos favorecen la llegada de más plaquetas que se irán sumando al trombo mural. Pero, además, el trombo no sólo se compone de plaquetas y polímeros de fibrina, sino de otras células de la sangre como eritrocitos y neutrófilos, también presentes en el mismo. El endotelio también tiene participación directa.

A día de hoy se sabe perfectamente que, en respuesta a estímulos físicos, químicos o hemodinámicos, el endotelio vascular es capaz de producir diferentes factores vasoactivos. Como veremos en el siguiente apartado de esta tesis, un factor vasoactivo de extrema relevancia es el NO (82), un gas generado en la célula endotelial mediante el paso metabólico de L-arginina a L-citrulina por la actividad en el endotelio de la enzima NOS_e (82). El NO generado, además de la acción vaso relajante que será descrita con posterioridad, posee también una implicación directa en el mecanismo antitrombótico de aspirina. De esta manera, en el año 1995 la Unidad de Investigación Cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos de Madrid demostró que la aspirina también tiene la capacidad de inhibir la activación plaquetaria ejerciendo su acción a través de los leucocitos (83). En estos experimentos se observó que la presencia de leucocitos no modificaba la agregación plaquetaria en ausencia de aspirina. Por el contrario, la presencia conjunta de aspirina y leucocitos sí inhibía significativamente la activación plaquetaria en respuesta a trombina, potenciando también la inhibición plaquetaria que la aspirina es capaz de ejercer ante la estimulación de las plaquetas por agentes como la epinefrina o el ADP (83). Puesto que los leucocitos también generan NO gracias a la actividad de una NOS similar a la que se encuentra en el endotelio, la aspirina estimula la formación de NO por el leucocito inhibiendo por este mecanismo la activación de las plaquetas (83). Gracias a estos resultados se abrió una nueva perspectiva de investigación y se postuló un nuevo, y hasta entonces desconocido, mecanismo de acción de la aspirina sobre la inhibición de la agregación plaquetaria. En este sentido, la aspirina activaría la producción de NO por parte del leucocito, el cual llegaría a la plaqueta desencadenando la generación de GMPc, un segundo mensajero celular a través del que actúa el NO. Así, se induciría una respuesta antiagregante de las plaquetas no sólo por la inhibición de la formación de TxA₂.

Posteriormente, en un estudio de 2003 se demostró que la aspirina también induce la liberación de NO por el endotelio, el cual protege a estas células del daño inducido por los radicales libres del oxígeno (Figura 14) (84). Ya en el año 2004, otro grupo, dirigido por el Dr. Paul-Clark, sugirió que la 15 epi-lipoxina A₄ podría guardar cierta implicación en la estimulación de la generación de NO por aspirina (85).

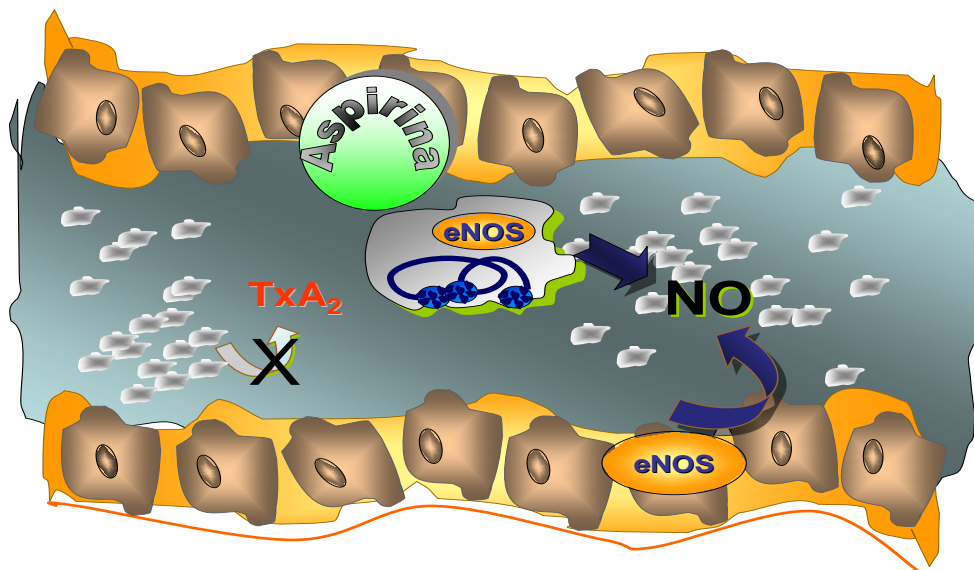


Figura 14: Mecanismos de antiagregación plaquetaria por Aspirina. La aspirina previene la formación de TxA₂ por las plaquetas y estimula la generación de NO por los neutrófilos y por el endotelio.

A raíz de la búsqueda de mecanismos alternativos según los cuales la aspirina inhibe la actividad plaquetaria, se ha sugerido también una acción reductora del efecto proagregante plaquetario que poseen los eritrocitos (86).

1.2.2.6. Otros mecanismos de acción de aspirina

Como ya se ha mencionado, existen otros mecanismos que contribuyen al beneficio clínico de la aspirina en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, aparte del efecto antitrombótico que el fármaco posee. En este sentido, diversos datos sugieren de una u otra manera que la aspirina tiene un efecto antioxidante, siendo capaz de reducir de manera directa la formación de radicales libres, especialmente la generación de ión superóxido. Así, se ha demostrado que la aspirina, además de reducir la formación de este ión también está capacitada para impedir que el radical hidroxilo forme derivados 2,3 y 2,5-dihidroxibenzonato. Además, la aspirina es capaz de acetilar los grupos amino de los residuos de lisina en las proteínas, protegiéndolas de la oxidación (87).

1.2.2.6.1. Efectos antiinflamatorios

La inflamación desempeña un importante papel en la patogénesis de diversas enfermedades cardiovasculares, según recogen diferentes estudios. Entre estas

enfermedades se encuentran la angina inestable, la hipercolesterolemia, la arteriosclerosis o incluso la hipertensión, todas ellas con un marcadísimo componente inflamatorio. En este sentido, y a modo de ejemplo, la angina inestable se caracteriza por un incremento en los niveles circulantes de fibrinógeno, proteína C reactiva, proteína amiloide A y diferentes citoquinas durante su fase aguda. Por ende, esta respuesta inflamatoria aguda se ha utilizado como marcador de mal pronóstico en el paciente con riesgo cardiovascular (88). En relación a estos hechos, resulta interesante saber que aquellos pacientes con niveles superiores de proteína C reactiva circulante, y por consiguiente con un mayor componente inflamatorio, son precisamente los que más beneficios obtienen del tratamiento con aspirina a la hora de prevenir un evento coronario agudo (89).

Antes de profundizar más quizás deberíamos hacernos una pregunta fundamental: ¿Estaríamos cayendo en una consideración demasiado simplista al decir que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por aspirina es suficiente para explicar su efecto antiinflamatorio? Se ha mencionado con anterioridad que la aspirina es un inhibidor no selectivo de ambas isoformas de la ciclooxigenasa, lo que ha permitido explicar en parte su efecto antiinflamatorio. En este sentido, ya se ha visto en varias ocasiones que los productos resultantes de la actividad de estas COX contribuyen a algunas de las manifestaciones de la inflamación, como el eritema, el edema, el dolor y la hiperalgesia, siendo estos mediadores más frecuentemente implicados las prostaglandinas PGE₂ y la PGI₂ (prostaciclina). A pesar de haberse encontrado también tromboxanos en exudados inflamatorios, su papel está por establecerse. Las células implicadas en estos procesos también sintetizan y liberan citoquinas u otros agentes involucrados en los fenómenos de vasodilatación, quimiotaxis, etc., que participan en la respuesta inflamatoria.

Por otra parte, conviene señalar que el producto metabólico normal de la aspirina en el cuerpo, el salicilato, muestra una menor eficacia en la inhibición de ambas isoformas de la COX. Los salicilatos no acetilados pueden tener funciones en la eliminación de radicales del oxígeno y, mientras que la aspirina inhibe irreversiblemente la COX-1, modifica la actividad enzimática de la COX-2 e inhibe la agregación plaquetaria, las especies no acetiladas del salicilato no son capaces de producir estas modificaciones. La COX-2, al ser modificada por aspirina, produce lipoxinas en lugar

de prostanoides, que tienen efectos antiinflamatorios. La aspirina también interfiere con los mediadores químicos del sistema calicreína-cinina, por lo que inhibe la adherencia de los granulocitos sobre la vasculatura que ha sido dañada. Además, estabiliza los lisosomas evitando así la liberación de mediadores de la inflamación e inhibe la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.

Remitiéndonos directamente a la interacción que se produce entre la plaqueta y el endotelio, se ha descrito que el hecho de incubar células endoteliales con dosis elevadas de aspirina produce la inhibición de la expresión de VCAM-1, así como de otras proteínas de adhesión de monocitos, en la superficie de las células endoteliales (90). Estas proteínas de adhesión facilitan la interacción entre el monocito y la célula endotelial contribuyendo al proceso inflamatorio, lo que supone una ayuda para el monocito cuando tiene que atravesar la barrera endotelial. La aspirina reduce la expresión de las proteínas de adhesión en la superficie endotelial y en consecuencia inhibe la activación de factores de transcripción, impidiendo que éstos lleguen al núcleo celular y estimulen la expresión de genes que codifican proteínas proinflamatorias. Si bien se observan efectos antiinflamatorios a dosis altas de aspirina, dosis bajas del fármaco también pueden reducir esta respuesta. Por ejemplo, se ha descrito que en ratones ateroscleróticos deficientes en la expresión del receptor de LDL, la administración *in vivo* de dosis bajas de aspirina provoca un decremento en la capacidad *ex vivo* de sus arterias aisladas para generar diferentes factores pro-inflamatorios como ICAM-1, TNF- α o MCP-1 (91). En relación con estos datos conviene destacar un hecho curioso, y es que aquellos pacientes que habitualmente toman Aspirina muestran unos niveles circulantes de mediadores proinflamatorios (IL-6) menores que los que no la toman, en el momento de sufrir un síndrome coronario agudo (92). Por si esto fuera poco, podemos ligar este hecho a la observación clínica de que estos mismos pacientes que habitualmente toman aspirina en el momento de sufrir un síndrome coronario agudo es más probable que se produzca una angina inestable que un infarto agudo de miocardio (92). Y no debemos olvidar que el grado inflamatorio del paciente cardiovascular no afecta a la capacidad de las bajas dosis de aspirina de inhibir la activación plaquetaria.

Por otra parte, estudios previos han servido para demostrar que la aspirina puede prevenir la expresión de factor tisular en monocitos y macrófagos previamente

activados (93). El factor tisular es una proteína que posiblemente sea inductora de la cascada de la coagulación. En este sentido, la mayor producción de citoquinas en aquellos pacientes que sufren determinadas patologías cardiovasculares se relaciona de manera directa con el consecuente aumento de expresión de factor tisular en monocitos y macrófagos. En este sentido, estos mayores niveles de factor tisular suponen un riesgo mayor de trombosis y depósito de fibrina, por lo que la aspirina no sólo inhibirá la activación plaquetaria a través de los mecanismos que hemos descrito ya en esta tesis, sino que también podrá impedir la formación de trombos y el daño tisular a través de su efecto antiinflamatorio.

Puesto que las plaquetas tienen capacidad inflamatoria, pueden liberar al exterior factores como la interleuquina-1 o la quimiocina RANTES. Además, las plaquetas no solo tienen capacidad inflamatoria sino que también son capaces de aumentar la reacción inflamatoria de factores pro-inflamatorios como la endotelina-1 (94). Por ende, según López-Farré et al el efecto antiinflamatorio de aspirina no solamente es directo sino que, gracias a su efecto antiplaquetario, es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria (95). En adición a estos datos, otro estudio (96) ha revelado que el mecanismo beneficioso de aspirina no quedaría relegado a su efecto antitrombótico sino también a su efecto antiinflamatorio a través de la inhibición de la liberación del agente proinflamatorio CD40L que, como vimos en los primeros apartados de esta tesis, es liberado por plaquetas además de otras células.

Considerando todos estos datos, la pregunta formulada al principio de este apartado obtendría su necesaria contestación y la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por la aspirina no sería suficiente para explicar su efecto antiinflamatorio.

1.2.2.6.2. Efectos analgésicos

La aspirina se muestra más eficaz al reducir el dolor leve o de moderada intensidad gracias a sus efectos sobre la inflamación, siendo probable que pueda inhibir los estímulos del dolor a nivel cerebral subcortical. Es un ácido orgánico débil que tiene al mismo tiempo una función de ácido carboxílico y de fenol, ya que también se considera como un orto fenol del ácido benzoico.

1.2.2.6.3. Efectos antipiréticos

La administración de aspirina sólo afecta de forma ligera a la temperatura normal del cuerpo. Sin embargo, la aspirina sí reduce la fiebre. Estos efectos antipiréticos que posee la aspirina están mediados seguramente por la inhibición que se produce en el sistema nervioso central de la enzima COX, así como por la inhibición de la interleucina-1 que liberan los macrófagos durante los episodios inflamatorios.

Además, se sabe que la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de los cartílagos y del hígado se interrumpe por acción de la aspirina cuando ésta difunde al espacio intermembrana para así actuar como transportador de los protones requeridos en los procesos de la respiración celular. En este sentido, cuando se administran dosis altas de aspirina, aparece fiebre como consecuencia del calor que se libera desde la cadena de transporte electrónico, localizada en la membrana interna de las mitocondrias. Este efecto de la aspirina a dosis altas contrasta con el efecto antipirético que ejerce el fármaco cuando se administra a dosis terapéuticas. Por otra parte, la aspirina induce en el organismo la formación de radicales de NO, lo que produce la reducción de la adhesión de los leucocitos. Como ya se ha mencionado anteriormente, la aspirina ejerce su efecto antiagregante también a través de las células leucocitarias. La adhesión de los leucocitos constituye uno de los pasos principales en la respuesta inmune a infecciones, aunque aún no hay evidencias concluyentes de que la aspirina sea capaz de combatir una infección (87). Sin embargo, existen datos publicados recientemente que sugieren que el ácido salicílico, así como otros derivados de aspirina, pueden modular las acciones de señalización celular por medio del NF- κ B, un complejo de factores de transcripción que desempeñan un rol importante en numerosos procesos biológicos, entre los que se encontraría la inflamación.

1.2.2.6.5. Antecedentes clínicos del tratamiento con aspirina

Para la Comunidad Científica, el reconocimiento del tratamiento con aspirina como algo fundamental en la patología cardíaca conllevó la necesidad de conocer los mecanismos que hacen de aspirina un fármaco fundamental en la prevención cardiovascular, fundamentalmente la prevención secundaria.

El efecto beneficioso en el infarto de miocardio mediante el tratamiento con aspirina se estableció en el Segundo Estudio Internacional sobre Supervivencia del Infarto (ISIS-2) (97), estudio en el que se reclutaron 18187 pacientes tras las primeras 24 horas después de sufrir un infarto agudo de miocardio. Tras su reclutamiento, estos pacientes se clasificaron en cuatro grupos de forma aleatoria: Al primer grupo se le administró estreptoquinasa, al segundo aspirina, al tercero estreptoquinasa y aspirina y al cuarto no se le administró ningún tratamiento. Transcurridas cinco semanas, aquellos pacientes que sólo habían recibido aspirina como tratamiento mostraron una significativa reducción de la mortalidad vascular, en una proporción cercana al 50% (97). ¿Cómo se podrían interpretar estos resultados? De cada mil pacientes tratados con aspirina, se podrían evitar 25 muertes y entre 10-15 infartos recurrentes o accidentes cerebrovasculares no fatales. Es importante señalar además que en este estudio el tratamiento con aspirina no produjo un aumento del riesgo de complicaciones derivadas de sangrado, incluyendo por supuesto la hemorragia cerebral o la necesidad de transfusión.

Por otra parte, en la literatura están recogidos diferentes estudios que han demostrado el papel beneficioso de que posee la aspirina en el tratamiento de la angina inestable. En este sentido se ha dejado claro, por una parte, que dosis bajas de aspirina disminuyen el riesgo de infarto de miocardio o muerte en aquellos pacientes que padecen isquemia asintomática tras un episodio de angina inestable o infarto no Q (98) y, por otra, que el tratamiento con dosis bajas de aspirina en este tipo de pacientes puede reducir la incidencia de muerte o de muerte e infarto de miocardio no fatal en combinación (99,100). De esta forma, conviene hacer referencia a una revisión de 4000 pacientes con angina inestable que recibieron tratamiento con aspirina o placebo, la cual reveló un 5% de reducción absoluta del riesgo de sufrir un accidente cerebrovascular no fatal, infarto de miocardio o muerte (9% frente al 14%) (101), lo que se corresponde con la prevención de 50 eventos vasculares por 1000 pacientes tratados con aspirina en 6 meses.

En cuanto al infarto de miocardio se refiere, existen 6 grandes estudios aleatorizados en los que solamente se empleó aspirina como único tratamiento después de un infarto de miocardio. Cinco de los seis estudios demostraron una reducción de la mortalidad en el tratamiento con aspirina (102-104). Por tanto, y de manera evidente, el

tratamiento con aspirina sigue siendo básico y esencial en la prevención de los problemas trombóticos desde el punto de vista de la cardiología intervencionista.

Haciendo referencia al beneficio del tratamiento con aspirina en la prevención primaria, un estudio realizado por médicos americanos aleatorizó 22071 individuos con edades comprendidas entre 40 y 84 años, a los que se administró, o bien una dosis de 325 mg de aspirina al día, o bien placebo. Sin embargo, el estudio sufrió una prematura interrupción tras cinco años puesto que se observó un 44% de reducción del riesgo de sufrir infarto de miocardio en el grupo tratado con aspirina (83). Aunque por el contrario, este estudio no demostró reducción de la mortalidad cardiovascular y no se registró un aumento significativo en el riesgo de ictus por hemorragia en el grupo tratado con aspirina (83).

Existen también diversos estudios que han servido para demostrar el efecto beneficioso de aspirina en pacientes que padecen angina crónica establecida, debido a que ésta aumenta el riesgo de sufrir un evento cardiovascular (105). En el estudio denominado Physician's Health Study, los pacientes con angina crónica establecida que recibieron tratamiento con aspirina mostraron un 87% de reducción en el riesgo de infarto de miocardio comparado con los pacientes que recibieron placebo (106).

Gracias a los resultados obtenidos a partir de los estudios sobre prevención primaria aquí destacados, así como los obtenidos de otros tantos, se puede establecer que el tratamiento con Aspirina no reduce la mortalidad cardiovascular pero sí disminuye significativamente el riesgo de infarto de miocardio no fatal. Por ende, el beneficio absoluto del tratamiento con aspirina aumenta cuanto mayor sea el riesgo de evento cardiovascular en el grupo tratado. En este sentido, en pacientes de alto riesgo, el beneficio del tratamiento con aspirina, especialmente la reducción en el desarrollo de infarto de miocardio, es mucho mayor que el riesgo de complicaciones hemorrágicas a diferencia de lo que ocurre en pacientes de bajo riesgo, en los que el tratamiento profiláctico puede acarrear serios problemas debido precisamente a esas complicaciones por hemorragia.

1.2.2.7. Resistencia a aspirina

Ya se ha visto que la aspirina es el tratamiento antiagregante plaquetario más empleado en la profilaxis de eventos tromboembólicos. De hecho, numerosos ensayos clínicos han demostrado que, en aquellos pacientes con alto riesgo de enfermedad cardiovascular, la terapia con aspirina disminuye el riesgo de infarto agudo de miocardio no mortal, ictus no mortal o muerte por causas vasculares (107,108). Sin embargo, se han observado casos en los que el tratamiento antiagregante es subóptimo, por lo que hay determinados pacientes que experimentan eventos cardiovasculares pese a la administración correcta de aspirina (109), existiendo en este mismo sentido, como veremos más adelante, estudios prospectivos que han demostrado que esta falta de respuesta a aspirina se asocia con un aumento del riesgo de eventos aterotrombóticos (110,111). Este fenómeno recibe el nombre de "resistencia a aspirina", término que no tiene una definición aceptada de forma universal y que se puede orientar desde dos enfoques diferentes. Desde un punto de vista clínico, la resistencia, o falta de respuesta, a aspirina se definiría como la aparición de eventos cardiovasculares tromboembólicos pese a recibir tratamiento continuado con aspirina en dosis terapéuticas. Por otro lado, desde un punto de vista bioquímico, la resistencia a aspirina queda definida o bien como el fracaso del fármaco a dosis terapéuticas en la prolongación del tiempo de sangrado, o bien como el fracaso en la reducción de producción de TxA₂ (112).

Todas estas observaciones han llevado a pensar que existen pacientes cuyas plaquetas son resistentes a la acción inhibitoria de aspirina, existiendo una variabilidad significativa en la función plaquetaria previamente demostrada en pacientes tratados con aspirina en múltiples ensayos clínicos, incluyendo pacientes sanos, con factores de riesgo y pacientes con enfermedad coronaria, vascular periférica y cerebrovascular (113-117). Dada la prevalencia de las enfermedades cardiovasculares, el impacto potencial de la resistencia a aspirina es bastante grande y tiene extrema importancia. Pese a que la prevalencia de la resistencia a aspirina no está realmente cuantificada, hay diferentes estudios que han sugerido que puede afectar entre un 7% y un 45% de la población. Por tanto, la identificación de pacientes no respondedores a aspirina y el alcanzar unos niveles adecuados de inhibición de sus plaquetas con terapias alternativas son objetivos potenciales que conllevan una notoria importancia clínica. Debido a esto, es muy importante conocer los mecanismos biológicos por los que en unos pacientes la aspirina es más eficaz que en otros en inhibir la activación plaquetaria. Los mecanismos

propuestos para explicar este síndrome de resistencia a aspirina son muy variados, siempre desde el punto de vista de la funcionalidad plaquetaria. Sin embargo, el mecanismo real por el que ocurre este fenómeno de resistencia a aspirina no es aún conocido aunque, probablemente, la respuesta se encuentre en una combinación de factores clínicos, biológicos e incluso genéticos que de alguna manera afecten la respuesta plaquetaria a aspirina (Tabla 1).

Tabla 1.- Mecanismos propuestos para explicar el síndrome de resistencia a aspirina.

	Factores	Efecto destacado
Clínicos	Incumplimiento del tratamiento	<i>No inhibición de las plaquetas</i>
	Tabaquismo	<i>Aumenta el recambio plaquetario</i>
		<i>Aumenta la función plaquetaria</i>
De riesgo	Diabetes	<i>Reduce la efectividad de aspirina sobre la plaqueta. Su mecanismo es desconocido</i>
Farmacodinámicos	Interacción con otros fármacos: AINEs.	<i>Atenuación de la acetilación de COX-1 por aspirina</i>
	Dosis-Respuesta	<i>Requerimiento de una dosis mayor de aspirina</i>
Biológicos	Biosíntesis de TxA ₂ no sensible a aspirina mediante la actividad COX-2	<i>No inhibición de las plaquetas</i>
	Diferente tipo de plaqueta en términos de contenido de proteínas asociadas a metabolismo energético, estrés oxidativo, citoesqueleto y apoptosis	<i>Diferente capacidad de la plaqueta de responder a aspirina</i>
	Existencia de moléculas circulantes que reducen el efecto de la aspirina	<i>Atenuación de la acetilación de COX-1 por aspirina</i>

Genéticos

Mutaciones y polimorfismos en el gen de COX-1

Generación de haplotipos asociados a la falta de respuesta a aspirina

Uno de los factores que proporcionarían una explicación más obvia sería el incumplimiento de la pauta de administración del fármaco y, de hecho, se ha confirmado que existe una significativa asociación entre la no adherencia del paciente al tratamiento y un mayor riesgo de padecimiento de episodios cardiovasculares recurrentes si se compara con aquellos pacientes que sí cumplen el tratamiento (118-120). Resulta más que evidente que la observación continua de la ingesta del fármaco es prácticamente imposible de forma ambulatoria y que la confirmación verbal de que el paciente toma correctamente aspirina también es un hecho no siempre es fiable. De este modo, muchos autores han considerado la relativamente elevada tasa de incumplimiento del tratamiento como una causa predominante de resistencia a aspirina (118,119,121). Por otra parte, conviene destacar ciertas vías de activación plaquetaria independientes de TxA₂ (122,123) que no son susceptibles de ser inhibidas por aspirina. Una de estas vías ya se ha mencionado con anterioridad y está mediada por el ADP, que se une a receptores específicos P2Y localizados en la superficie de la plaqueta. Existen, además, otros receptores que participan en la activación plaquetaria independiente de TxA₂, entre ellos los de epinefrina y trombina, y receptores glicoproteicos de colágeno y fibrinógeno, que también se han descrito en apartados anteriores de esta tesis doctoral. En este sentido, se ha descrito una mayor respuesta in vitro de estos receptores (124,125) en pacientes con plaquetas resistentes a aspirina, además de que, in vivo, parece que la activación plaquetaria en el sitio del daño vascular en pacientes con enfermedad arterial coronaria está inducida principalmente a través de vías mediadas por ADP.

Por otra parte, el TxA₂ puede ser sintetizado también por la enzima COX-1 presente en monocitos, macrófagos (122,126), megacariocitos y una subpoblación de plaquetas inmaduras (127,128), hecho que se pone de manifiesto principalmente bajo un estado inflamatorio.

Además, diferentes estudios aleatorios controlados han servido para demostrar que la terapia con una dosis baja diaria de aspirina puede suprimir la actividad de COX-1 (129,130), corroborando el hallazgo de que una dosis de 325 mg de aspirina no puede ofrecer una inhibición adicional de la enzima en comparación con una dosis de 81 mg, debido a que este proceso es rápido, irreversible y se satura a dosis bajas, de ahí que sea un mecanismo independiente de la dosis (131). Sin embargo, y a pesar de que no hay un consenso acerca de la dosis de aspirina ideal para la prevención primaria y secundaria de episodios aterotrombóticos (132,133), parece ser que unas dosis mayores de aspirina pueden ser más eficaces en aquellos ensayos clínicos que utilizan criterios de laboratorio para medir la resistencia a aspirina (134-137). Aunque, por el contrario, estos resultados no han podido ser confirmados en estudios con resultados clínicos de punto final.

Por otra parte, existe cierta variabilidad en la absorción, biodisponibilidad, metabolismo y excreción de aspirina. En este sentido, y como ya se ha visto previamente, el ácido acetilsalicílico que se administra por vía oral está sometido a una rápida absorción mediante difusión a través de la mucosa gástrica proximal del intestino delgado. El pH gástrico influye en la absorción del ácido acetilsalicílico. De esta manera, medicamentos que producen una disminución del ácido aceleran la absorción mientras que la presencia de alimentos la retrasa (138). Mientras los salicilatos permanecen en el intestino, una pequeña proporción de los mismos puede ser inactivada por la acción de esterasas presentes en las vellosidades del epitelio intestinal. Una vez llega al torrente sanguíneo, la aspirina llega al hígado, donde es descompuesto. En este sentido, la variabilidad entre individuos en la expresión de enzimas que participan en el metabolismo de aspirina puede ser en parte responsable del fracaso de ésta a la hora de producir la inactivación plaquetaria.

Además, hay que señalar que, cuando aspirina se encuentra en el torrente sanguíneo, existe una gran competencia con otros medicamentos, especialmente los AINEs, por los sitios de unión a proteína, de manera que unos niveles mayores de salicilato en plasma pueden aumentar temporalmente su efecto antiagregante plaquetario.

La tasa de eliminación de salicilato se puede ver afectada por cambios en el pH urinario, ya que con una orina más alcalina se produce una más rápida eliminación de productos derivados de aspirina (138). Aunque no hay recogidos en la literatura suficientes datos como para poder establecer una asociación directa entre el tabaquismo y el síndrome de resistencia a aspirina, el análisis mediante PFA-100 revela ciertos indicios de que las plaquetas de individuos fumadores muestran una mayor propensión a ser resistentes a la acción de la aspirina en comparación con individuos no fumadores. El tabaquismo crónico tiene un efecto procoagulante, a pesar de que el paciente en cuestión esté recibiendo tratamiento con aspirina y se adhiera a al mismo (139).

Por otro lado, pese a que la inhibición plaquetaria adecuada se alcanza durante el primer mes de tratamiento con aspirina (140-142), a largo plazo se ha descrito cierta pérdida de la ventaja terapéutica, especialmente si se alcanzan o superan los 500 días de tratamiento (134,141,142). Este efecto coincide con un aumento del riesgo de padecimiento de un evento cardiovascular adverso en pacientes que toman aspirina (143,144).

Desde el punto de vista molecular, nuestro grupo ha continuado investigando los posibles mecanismos que podrían estar relacionados con la resistencia a aspirina. En este sentido, en estudios previos hemos analizado mediante proteómica los cambios en las diferentes proteínas expresadas en el plasma de pacientes sensibles y resistentes a aspirina con enfermedad coronaria isquémica establecida. En este sentido, nuestro grupo determinó si la DBP podría modificar la capacidad de aspirina para inhibir la enzima COX-1, encontrándose que en plasma existían tres isoformas de DBP aumentadas significativamente en pacientes resistentes a aspirina (145). Es bien conocido que la DBP se encarga de unir y transportar análogos de la vitamina D (146), además de ser un potente activador leucocitario (147). De esta manera, a partir de sangre total, se obtuvieron plaquetas procedentes de voluntarios sanos que no habían recibido previamente dosis alguna de aspirina que se incubaron en un sistema *in vitro* ideado por nuestro equipo. Las incubaciones se realizaron en presencia y/o ausencia de aspirina y DBP. Posteriormente, a partir de plasma rico en plaquetas obtenido de los mismos pacientes se analizó la posibilidad de que el efecto de DBP en la inhibición de la producción de TxA₂ por acción de la aspirina pudiese relacionarse con un efecto directo de DBP sobre la plaqueta. Los resultados obtenidos a partir de este estudio revelarían

una fuerte evidencia sobre los mayores niveles plasmáticos de las tres isoformas de DBP en pacientes resistentes a aspirina, haciendo de esta proteína un interesante marcador de resistencia a aspirina y, por ende, de riesgo cardiovascular. Esto se relacionaría con la idea demostrada y ya mencionada anteriormente de que los leucocitos pueden estar implicados en la activación de las plaquetas y, de hecho, existen diversos estudios en los que se ha puesto de manifiesto que DBP puede aumentar la actividad quimiotáctica de los neutrófilos (148,149).

Por otra parte, en este mismo grupo comprobamos que en las plaquetas resistentes a aspirina existían niveles aumentados de la isoforma 1 de la cadena γ de fibrinógeno, la misma isoforma que ya habíamos descrito aumentada en pacientes que habían sufrido síndrome coronario agudo (150). Como ya se había mencionado en estudios previos, debido a un mecanismo de escisión alternativa el fibrinógeno γ presenta diferentes variantes que modifican la formación de fibrina y podrían estar asociadas con un aumento del riesgo trombótico, hecho que concuerda con una mayor incidencia de episodios cardiovasculares y cerebrovasculares asociada al síndrome de resistencia a aspirina (151,152).

Se podría definir también una resistencia farmacológica a aspirina, como ocurre con los AINEs, entre ellos el ibuprofeno. Ello es debido a la existencia de determinados antecedentes que dan a entender que la ingesta de ibuprofeno previamente a la de aspirina disminuye la eficacia de ésta para inhibir la COX-1 contenida en la plaqueta (153). Este hecho parece estar relacionado con el bloqueo que el ibuprofeno ejerce sobre el canal por el cual la aspirina accede a la serina 520 de la COX-1 (Figura 15).

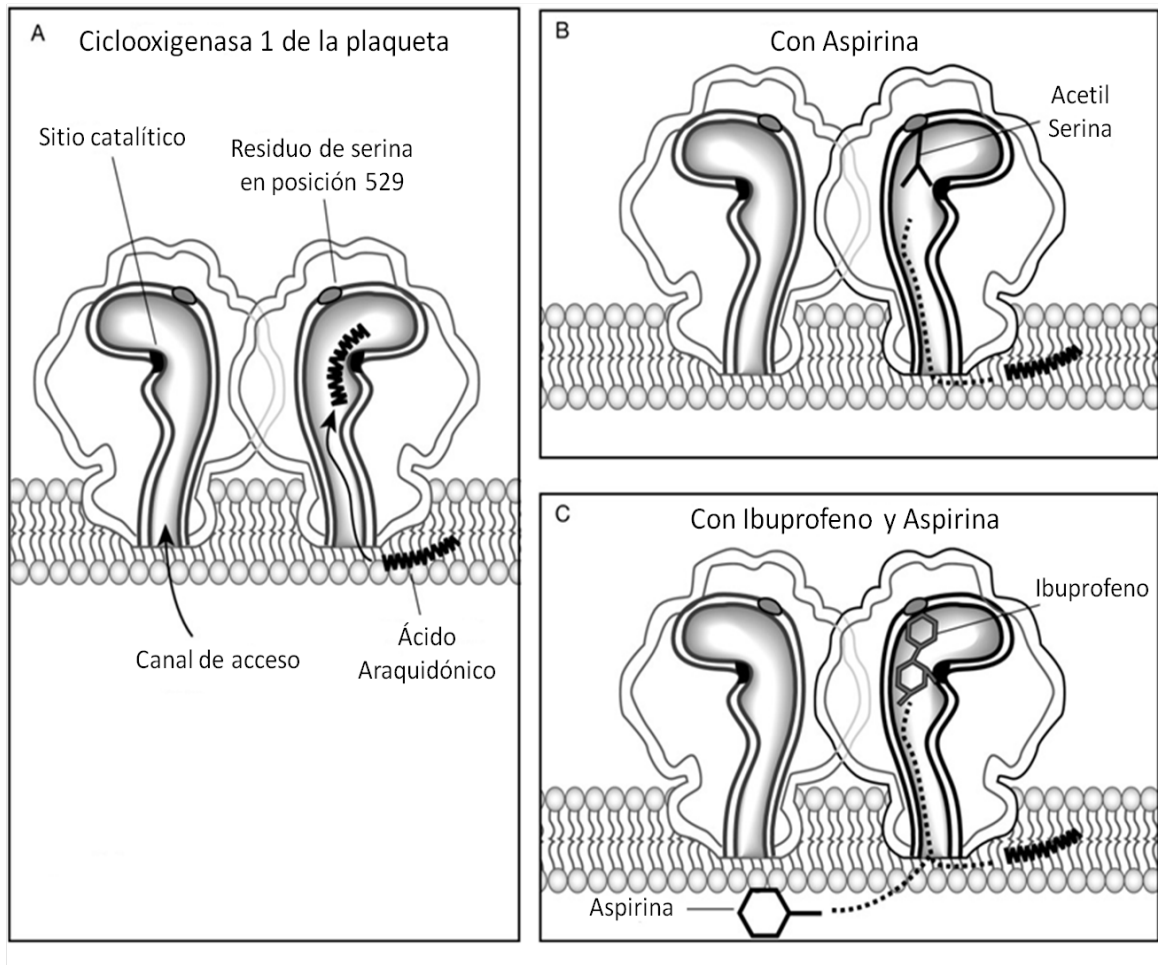


Figura 15.- Mecanismo de resistencia a aspirina modificado por la administración de ibuprofeno
(Modificado de N Engl J Med 2001; 345: 1809-17)

Reincidiendo en la cuestión de la relevancia clínica que posee la resistencia a aspirina, podemos decir que ésta ha sido objeto de estudio en pacientes con antecedentes con enfermedad cardiovascular establecida (154-157), enfermedad coronaria (152,158), accidentes cerebrovasculares (152,159), enfermedad vascular periférica (160), intervenciones coronarias percutáneas y *by-pass* arteriocoronario (157,160). Por tanto, los datos aportados por todos aquellos estudios que se han focalizado en esta relevancia clínica del síndrome de resistencia a aspirina revelan una significativa correlación entre éste y un mayor riesgo cardiovascular en aquellos pacientes con plaquetas resistentes a aspirina con respecto a los que tienen plaquetas sensibles a su acción.

En este sentido, con el fin de demostrar la asociación entre la resistencia a aspirina y el mayor riesgo de eventos cardiovasculares, a lo largo del tiempo se han ido desarrollando diferentes meta-análisis (161,162) entre los que se encuentran estudios

prospectivos y retrospectivos, habiendo confirmado todos ellos la aparición de eventos cardiovasculares en aquellos pacientes que no respondían al tratamiento con aspirina. Por tanto, convendría destacar dos meta-análisis de entre toda la variedad existente de ellos en la literatura debido a que proporcionan datos interesantes que relacionan la resistencia a aspirina en laboratorio con el riesgo de sufrir un episodio aterotrombótico. Por una parte, debemos reseñar el trabajo llevado a cabo por Krasopoulos et al (163), en el que se identificaron 20 estudios tras una búsqueda sistemática, a través de los cuales se evaluó el riesgo de padecimiento de episodios cardiovasculares en 2930 pacientes con enfermedad cardiovascular que recibían terapia con aspirina como prevención secundaria. De la totalidad de pacientes que se incluyeron en el estudio, un 28% era resistente a aspirina, condición demostrada mediante el empleo de diferentes ensayos de laboratorio. A su vez, la resistencia a aspirina fue menos prevalente en hombres y más en pacientes con insuficiencia renal previa. Todos los pacientes resistentes a aspirina, independientemente de los síntomas clínicos subyacentes, presentaban gran riesgo de muerte, síndrome coronario agudo, insuficiencia en intervención vascular, o un nuevo evento cerebrovascular.

Trece de los estudios informaron sobre aspirina exclusivamente como agente antiagregante plaquetario, con dosis diarias que oscilaban entre los 75 hasta los 325 mg como terapia. De los trece estudios, uno de ellos registró dosis diarias de 500 mg tres veces al día y seis incluyeron una dosis de carga de clopidogrel o tirofiban, otro inhibidor antiplaquetario, o ambos, como complemento de la terapia. De los estudios recogidos en este meta-análisis, varios se utilizaron para evaluar el estado de los pacientes que recibían aspirina, especialmente a través de la medición en suero de los niveles de TxA₂ en relación con la hemostasia plaquetaria, de un ensayo de adhesión plaquetaria mediante colágeno y de agregometría en plasma rico en plaquetas y en sangre total. En definitiva, Krasopoulos et al indicaron (163), en función de sus análisis, que el efecto de la resistencia a aspirina sobre los resultados clínicos es aplicable a la totalidad de pacientes con riesgo de sufrir episodios cardiovasculares y cerebrovasculares que reciben aspirina. En este sentido, el aumento del riesgo de padecer estos eventos en pacientes con plaquetas resistentes a aspirina se produce en aquellos que tienen enfermedad cardiovascular establecida o enfermedad coronaria arterial, aquellos que se han sometido a intervención coronaria percutánea o coronaria, a un injerto de *bypass*, o a otros procedimientos, o que hayan sufrido un derrame cerebral.

Como se mencionó anteriormente, existe un segundo meta-análisis al que se va a prestar atención en esta tesis, llevado a cabo por Snoep et al. Al igual que Krasopoulos et al, este grupo recogió datos procedentes de 16 estudios, en los que se estudió un total de 2296 pacientes. Estos estudios evaluaron la probabilidad de sufrir un evento cardiovascular agudo recurrente, a pesar del tratamiento con aspirina para prevención secundaria. Tres de los estudios incluidos en este segundo meta-análisis se ajustaron por incumplimiento del tratamiento con aspirina. En este grupo de pacientes seleccionados, se clasificó a un 27% como resistentes a aspirina, a través de diferentes ensayos de laboratorio. Ambos meta-análisis asumieron que resistencia a aspirina calculada en el laboratorio era una variable categórica (presente frente a ausente).

La carencia de marcadores de los que se dispone para identificar a aquellos pacientes resistentes a aspirina, al margen de los niveles aumentados de DBP en pacientes resistentes a aspirina descritos por nuestro grupo, es un aspecto de vital importancia y, por si esto fuera poco, no existen precisamente estudios en la literatura que analicen el papel de los leucocitos, eritrocitos, las propias plaquetas o incluso de las proteínas circulantes en el plasma que pudieran servir de biomarcadores para identificar este tipo de pacientes e incluso intervenir en el proceso de inhibición de aspirina sobre la COX-1 plaquetaria y, en consecuencia, sobre la mayor o menor capacidad de aspirina de inhibir la actividad de las plaquetas. Por estas razones, en posteriores apartados se prestará atención a otro importante biomarcador, el NO.

Atendiendo a los resultados de estudios previos puede llegarse a la conclusión de que la aspirina estimula la actividad de la enzima NOS3 en las plaquetas, produciendo un incremento en la producción de NO y favoreciendo los efectos antiplaquetarios de aspirina (164). Sin embargo, atendiendo a nuestro conocimiento, no se ha analizado si la producción de NO por las plaquetas puede estar asociada con la respuesta de éstas a aspirina.

1.3. EL ÓXIDO NÍTRICO

1.3.1. SÍNTESIS Y FORMACIÓN

El NO sintetizado deriva de la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina por acción de la enzima NOS (82). Nos encontramos pues ante una reacción extremadamente compleja que precisa oxígeno molecular y diversas coenzimas, como son BH₄, NADPH, FAD, FMN, grupo hemo y calmodulina (Figura 16). El NO desempeña numerosas funciones, puesto que se forma prácticamente en todas las células del organismo. Y a pesar de que la síntesis se realiza siempre a partir de arginina por la enzima NOS, en los tejidos se pueden encontrar diferentes isoformas de la enzima. En este sentido, y como se volverá a ver más adelante, en las plaquetas, el NO parece estar producido fundamentalmente por la actividad de una NOS constitutiva, la NOS3, aunque una pequeña cantidad de NO proceda de la actividad de una forma inducible de la enzima, la NOS2. El NO derivado de la plaqueta supone un bucle de retroalimentación negativa al reducir el reclutamiento de nuevas plaquetas al trombo creciente (165,166). En efecto, se ha sugerido que las alteraciones en la biosíntesis del NO por las plaquetas pueden contribuir al incremento de los procesos trombóticos y eventos coronarios (167).

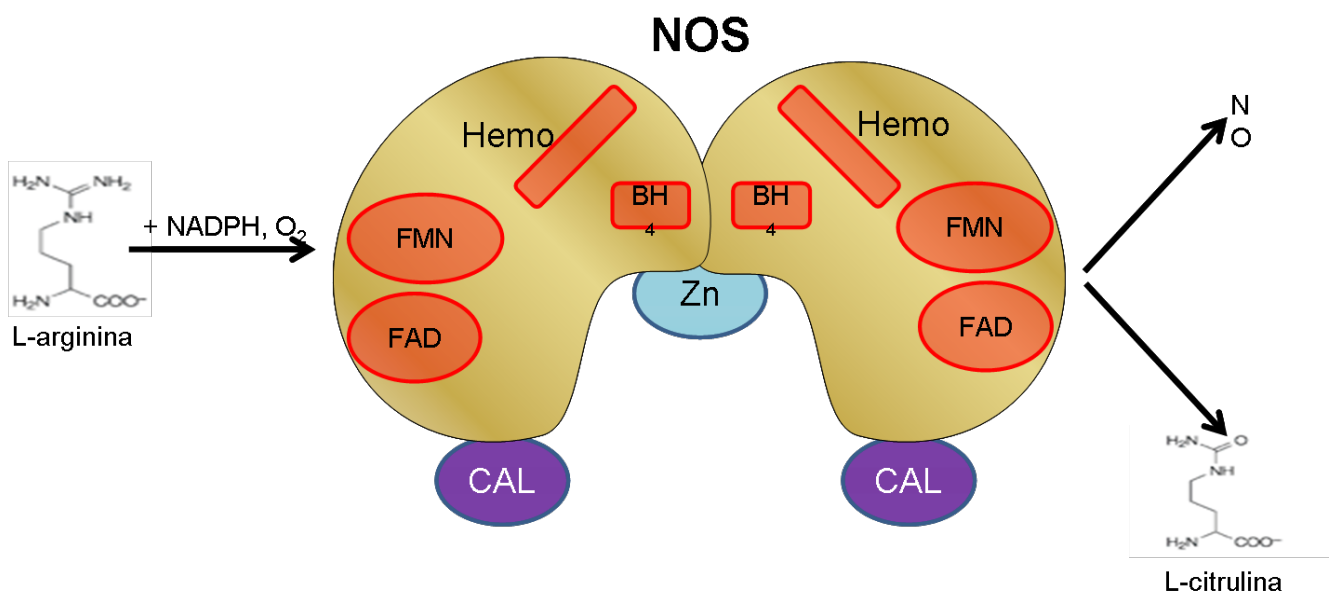


Figura 16. Conversión de L-arginina en L-citrulina por acción de la enzima NOS en presencia de oxígeno molecular, BH₄ y calmodulina

Existen diferentes factores que pueden influir sobre la actividad de la enzima NOS3, entre ellos, antagonistas endógenos de la L-arginina circulante, como el ADMA. Estos factores se encuentran aumentados en condiciones fisiopatológicas en las que la producción de NO se ha visto disminuida (168). Además, en las plaquetas humanas, el ADMA es capaz de inhibir el transporte de L-arginina (169).

El diferente nivel de expresión de la proteína NOS3 puede estar influenciado también por la capacidad de las plaquetas de producir NO. En este sentido, hay evidencias de que el nivel de expresión de NOS3 podría verse modulado por diversos factores, incluyendo los genéticos. De esta manera, la mutación T⁻⁷⁸⁶→C, localizada en la región flanqueante 5' del gen NOS3, es responsable de la reducción de la actividad del promotor del gen NOS3, lo que compromete la expresión de la enzima NOS3 y, por ende, la síntesis de NO (170).

La regulación de la actividad NOS3, que describiremos con detalle en el siguiente apartado de esta tesis doctoral, no sólo es importante para proteger la expresión de NOS3 sino también su fosforilación. En esta línea, se ha demostrado que la estimulación de la actividad de NOS3 está estrechamente relacionada con el estado de fosforilación (171). Así, diferentes residuos de aminoácidos pueden fosforilarse en la secuencia de la enzima aunque, en humanos, la fosforilación se produce en la Serina 1177, promoviendo la actividad de la NOS3 (172).

1.3.2. EL ÓXIDO NÍTRICO Y LA PARED VASCULAR

1.3.2.1 Acción vascular del NO

El endotelio vascular humano se constituye aproximadamente por un área que supera los 1000 m² y tiene un peso que ronda los 3 kilogramos. Durante mucho tiempo se pensó que la única función del endotelio vascular era de naturaleza pasiva. De hecho, fue la paradoja de la acetilcolina, que describiremos en apartados posteriores de esta tesis doctoral, la que condujo al descubrimiento de las funciones del endotelio, dejando al fin aparcada esa tosca y simplista creencia de que el endotelio no era más que una mera membrana semipermeable que simplemente se limitaba a separar la sangre de las estructuras adyacentes y regulaba el intercambio de nutrientes y fluidos entre el plasma

y la pared vascular. Puesto que la acetilcolina es un vasodilatador al ser administrada *in vivo*, no dejaba de ser curioso que se comportase como un vasoconstrictor al administrarse en preparaciones *in vitro* de CMLV. Esta cuestión volverá a ser planteada más adelante, pero como anticipo se debe destacar que Furchgott y Zawadzki fueron los que resolvieron esta curiosa dicotomía, demostrando que la acetilcolina precisaba la integridad del endotelio para producir su efecto vasodilatador a través de la estimulación de la liberación de un factor, el FRDE (173). Fue en 1988 cuando Palmer y Moncada confirmaron que el NO era este FRDE. Años después, se ha ido trazando una línea investigadora a lo largo de la cual numerosos estudios se han desarrollado con el fin de demostrar que las células endoteliales, además de cubrir la superficie luminal de los vasos sanguíneos, son capaces de sintetizar y liberar varios factores relacionados directamente con la homeostasis sistémica. A día de hoy se conocen muchas funciones del endotelio, como la regulación de la agregación plaquetaria, cuyos mecanismos hemos descrito con anterioridad en esta tesis. Además, el endotelio vascular también participa en la coagulación sanguínea, la modulación del tono vascular, la regulación de la proliferación de las células de músculo liso, la regulación de los lípidos plasmáticos, la capacidad de reclutar células sanguíneas, el transporte capilar de agua, solutos y macromoléculas, la prevención de la adhesión de las células sanguíneas a la pared del vaso, la regulación de los procesos inmunológicos, de inflamación, la regulación de la proliferación, movilidad y reparación vascular, la modulación del tono del músculo liso vascular, y la síntesis y liberación de diversos componentes de la matriz extracelular (174-176). Por estas razones, el endotelio es, según el conocimiento actual, el mayor órgano paracrino presente en el cuerpo humano.

La integridad del endotelio es algo fundamental para el mantenimiento de la estructura y el funcionamiento normal de la pared vascular. Tanto el desarrollo de la función normal del endotelio como la integridad endotelial son esenciales para proporcionar una superficie antiagregante para las plaquetas y antiadhesiva para los leucocitos. Por otra parte, el endotelio ejerce efecto doble sobre el crecimiento celular, siendo de gran importancia el que afecta a las células musculares, puesto que es capaz de liberar factores promotores e inhibidores de su crecimiento (177).

Las células endoteliales constituyen un tejido activo desde un punto de vista metabólico, el cual puede actuar como sensor y transductor de estímulos químicos, mecánicos y celulares. Dada la situación física que tiene el endotelio dentro del

organismo, está predispuesto para interactuar con una enorme diversidad tanto de células como de agentes endocrinos y paracrinos. En este sentido, el endotelio tiene receptores específicos para ambos tipos de elementos. A su vez, el endotelio produce y libera diferentes sustancias vasoactivas, tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras. En consecuencia, todas estas características confieren al endotelio un importante papel en la respuesta fisiológica del organismo ante diversos tipos de estímulos.

Por tanto, es relativamente fácil comprender que las alteraciones de la fisiología endotelial se relacionen con la génesis y el desarrollo de la mayor parte de patologías de origen cardiovascular, ya sea la hipertensión (178), aterosclerosis (179), trombosis o incluso procesos inflamatorios. De hecho, existen muchos factores capaces de producir disfunción endotelial, ya sean infecciones, agentes oxidantes, hipercolesterolemia o turbulencias sanguíneas. Aunque las células endoteliales puedan responder a estas agresiones de manera muy rápida en ocasiones, la respuesta endotelial suele ser a largo plazo, mediante la modulación de la expresión génica de diversas proteínas implicadas en la adaptación funcional. Así, por ejemplo, como resultado de la agresión al endotelio, se disminuye la producción de un potente vasodilatador, el NO, hecho que da pie a un efecto que se complementa con la inducción de la síntesis de endotelinas, proteínas de acción vasoconstrictora.

La producción de NO por el endotelio vascular está considerada como uno de los principales mecanismos implicados en el funcionamiento de éste. Este gas difunde fácilmente desde las células endoteliales a las células de músculo liso de la pared vascular y es precisamente allí donde estimula a la enzima GCS, que cataliza la reacción de formación de GMPc a partir de GTP. El GMPc es un segundo mensajero que desencadena entonces la vasodilatación arterial. De esta forma, la síntesis de NO regula el flujo sanguíneo en respuesta a estímulos tales como el llamado “estrés de roce” de la sangre o la acción de moléculas circulantes como la bradiquinina o la acetilcolina. Sin embargo, las funciones del NO endotelial son muy diversas pues, además de controlar el tono vascular, contribuye al mantenimiento de la estructura de la pared arterial, reprimiendo la proliferación de las células musculares lisas. Por otra parte, el NO tiene acción antiagregante sobre las plaquetas e inhibe la adhesión de los leucocitos al endotelio (180).

Se ha mencionado en el apartado anterior que existen diferentes isoformas de la enzima NOS expresadas en diferentes tejidos. La enzima constitutiva del endotelio es la NOS3, también denominada NOSe y es la responsable de la formación habitual de NO. Tanto en el endotelio como en otras células de la pared vascular, macrófagos, etc., se puede inducir otra isoforma, denominada NOS2 o NOSi, en situaciones de inflamación.

1.3.2.2. Regulación general de la síntesis de NO

La regulación de las concentraciones de NO es muy complicada y no se conoce todavía por completo. Sí se sabe que su producción disminuye durante la aterosclerosis avanzada, tanto por una disminución en la síntesis de la NOS3 como por un aumento en su degradación. Como la vida media del NO es muy breve, del orden de segundos, bajo estas condiciones habría muy poca cantidad de NO disponible para sus funciones endoteliales. Es interesante añadir además, que si la disponibilidad de arginina o de BH4 se reduce, en vez de formarse NO se produciría entonces la síntesis alternativa del radical superóxido (O^{2-}) por la NOS3.

La regulación de la actividad de la enzima NOS se lleva a cabo por un amplio catálogo de mecanismos transcripcionales y postraslacionales (Figura 17).

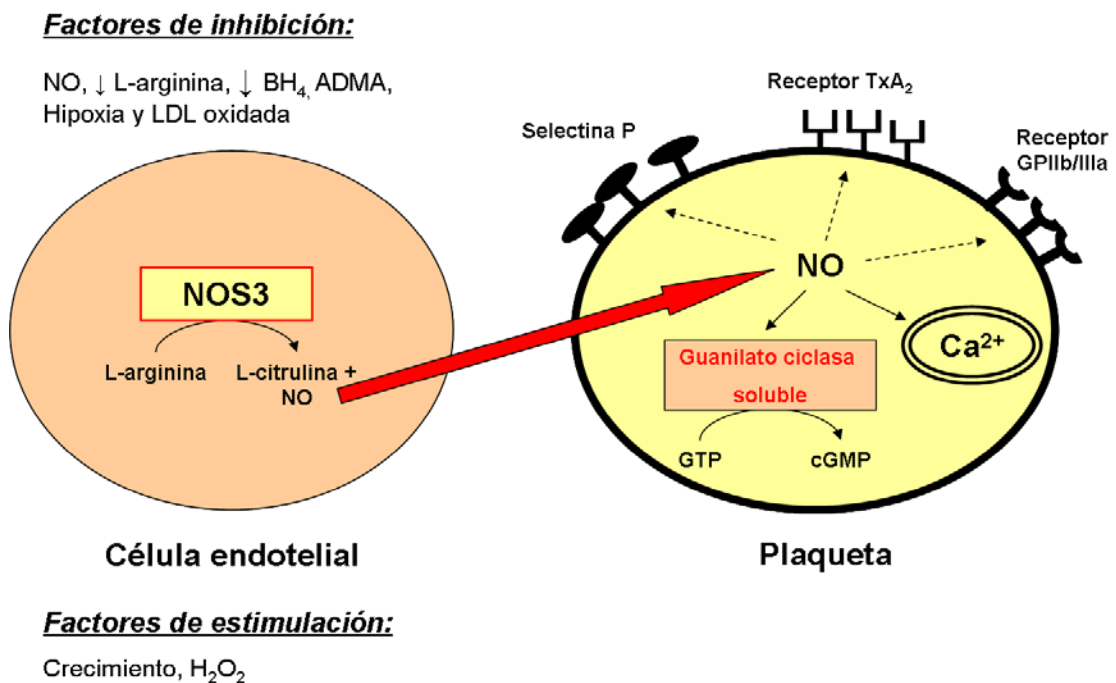


Figura 17. Mecanismos de regulación de la síntesis de NO.

Existen mecanismos de regulación que son específicos de la isoforma de NOS de la que se trate, mientras que otros mecanismos pueden considerarse comunes a todas las isoformas. La regulación de la biodisponibilidad de NO viene determinada por la regulación de la actividad de la enzima NOS. En este sentido, el NO ejerce una retroalimentación negativa sobre la actividad de la enzima, lo que determina la disminución de su propia síntesis. Esta inactivación que se produce en la enzima es temporal y se produce cuando el NO se une a su grupo hemo de manera reversible (181,182). La capacidad de la NOS de producir NO se recupera al disociarse el NO del grupo hemo al que previamente se ha unido de manera reversible.

1.3.2.2.1. Biodisponibilidad de BH4

Por otra parte, otro importante factor que regula la actividad de esta enzima lo constituyen los niveles de BH4. BH4 es un factor necesario para la síntesis de NO ya que es fundamental para el acoplamiento de la reducción del átomo de hierro a la síntesis de NO. Unos bajos niveles de BH4 pueden suponer el desacoplamiento de la reducción de O₂ con la consecuente generación de superóxido, la disociación del dímero de NOS o la falta de unión del NO al grupo hemo de la enzima (183,184). En este sentido, la dimerización de la enzima es fundamental para su actividad, activándose como consecuencia del secuestro del grupo hemo, proporcionándole unas condiciones óptimas para la unión de L-arginina y BH4. A su vez, se favorece la transferencia de electrones desde los dominios reductasa hasta el dominio oxigenasa del grupo hemo (185,186). De esta forma, el NO puede inhibir su propia síntesis limitando la dimerización de la enzima.

1.3.2.2.2. El rol desempeñado por la L-arginina en la síntesis de NO

Según determinados estudios con modelos animales, la administración de L-arginina presenta efectos beneficiosos en enfermedades como la hipertensión, la aterosclerosis coronaria (187,188). A su vez, otros estudios han corroborado el efecto protector que tiene la L-arginina sobre el endotelio (189,190). Sin embargo, no hay unanimidad en cuanto a los efectos beneficiosos de la L-arginina, habiéndose realizado numerosos estudios con resultados contradictorios. Así, Rector et al desarrollaron un estudio aleatorizado doble ciego con placebo en el que se administró L-arginina a pacientes con fallo cardíaco durante un período de 6 semanas. Pasado este tiempo se registró una mejoría en el flujo sanguíneo del antebrazo así como en la distensibilidad

arterial en comparación con los sujetos control incluidos en el estudio. Sin embargo, Wilson et al (191) desarrollaron un estudio aleatorizado en el que se trataba con L-arginina durante 6 meses a un grupo de pacientes con enfermedad arterial periférica y claudicación intermitente, comparándose frente a un grupo al que se le administraba un placebo. En este sentido, la suplementación a largo plazo con L-arginina no traía consigo consecuencias beneficiosas, no aumentaba la producción de NO ni mejoraba la reactividad vascular. De acuerdo con estos resultados, otro estudio desarrollado por Blum et al, en el que se incluyeron pacientes con enfermedad coronaria establecida, no se observó ninguna mejoría en la vasodilatación dependiente del endotelio ni en el flujo sanguíneo vascular en comparación con el grupo al que se le había administrado placebo (192). Estos datos contradictorios quedarían medianamente explicados gracias a la "paradoja de la L-arginina" que, como ya hemos apuntado, será explicada convenientemente en apartados posteriores. Lo que queda bastante claro es que la L-arginina desempeña sus efectos beneficiosos gracias al aumento de los niveles vasculares de NO a través de su regulación de la vía GMPc-NO en las células del endotelio y del miocardio.

1.3.2.2.3. Mecanismos transcripcionales y postranscripcionales reguladores de la actividad de la NOS

Además de los mecanismos postraslacionales que regulan la actividad de la NOS, existen diversos mecanismos transcripcionales y postranscripcionales que afectan la actividad de la enzima. En este sentido, uno de los principales mecanismos de regulación de la actividad de la enzima NOS3 es la fosforilación. Según Fleming et al, esta fosforilación está desempeñada por numerosas enzimas quinasas y está condicionada por la biodisponibilidad de numerosos cofactores y sustratos. En este sentido, tanto la fosforilación de la NOS como su localización subcelular desempeñan en conjunto un importante mecanismo de regulación de la producción de NO. De esta manera, podemos mencionar estudios previos, entre ellos el desarrollado por Boo et al en el que emplearon mutantes diseñados con la enzima dirigida a localizaciones subcelulares específicas o con una fosforilación específica en Ser 1177. Los mutantes con NOS3 dirigida a la membrana plasmática y al aparato de Golgi presentaban una mayor producción de NO frente a los mutantes con NO localizada en el citosol por deficiencia de miristoilación. Del mismo modo, los mutantes que imitaban la fosforilación en Ser 1177 presentaban mayores niveles de NO. Por otra parte, en otros

estudios se ha demostrado que la serina / treonina proteína quinasa Akt / PKB media la activación de la eNOS, hecho que aumenta la producción de NO (172). De esta forma, comprobaron que la inhibición de la vía de la fosfatidilinositol-3-OH quinasa / Akt o una mutación del sitio de unión de Akt en la enzima eNOS (en la serina 1177) atenuaba la fosforilación de serina, previniendo la consecuente activación de la eNOS. En este mismo estudio, Dimmeler et al, comprobaron que imitando la fosforilación de la Ser 1177 se mejoraba directamente la actividad enzimática y se alteraba la sensibilidad de la enzima a Ca^{2+} , lo que hacía que su actividad máxima se alcanzase a concentraciones sub-fisiológicas de Ca^{2+} . Por lo tanto, la fosforilación de la eNOS por Akt representaría un importante mecanismo de regulación Ca^{2+} -independiente para la activación de la eNOS.

Ya ha quedado claro en este trabajo de tesis doctoral que el NO derivado del endotelio desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del endotelio vascular. Pero además, el NO también está implicado en el proceso de angiogénesis promovido por el VEGF, hecho demostrado en ensayos in vitro e in vivo (193-195). Por ende, para la migración de las células endoteliales promovida por el VEGF se necesita la activación de la NOS3 por fosforilación en el residuo Ser 1777 mediada por la enzima Akt. A su vez, otros estudios anteriores han sugerido que la estimulación con VEGF produce un aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (196), lo que desencadena la síntesis de NO dependiente de la unión de Ca^{2+} a calmodulina, a pesar de que la activación de la NOS por esta vía sólo dura un corto período de tiempo.

1.3.2.2.4. Efecto regulador de los inhibidores endógenos de la síntesis de NO

Por otra parte, hay que señalar el efecto regulador de los inhibidores endógenos de la síntesis de NO, el cual se suma al ejercido como consecuencia de la mayor o menor biodisponibilidad de cofactores necesarios para el correcto funcionamiento de la enzima NOS. Estos agentes se describen en el apartado 1.3.4 de esta tesis doctoral.

1.3.3. EL ÓXIDO NÍTRICO Y LA PLAQUETA

En el año 1987 se demostró que al estimular con bradiquinina células endoteliales en cultivo, la cantidad de NO que se liberaba era suficiente para inhibir la adhesión plaquetaria (197). Además, el NO generado en los vasos coronarios y

pulmonares inhibe la agregación plaquetaria bajo condiciones de un flujo sanguíneo constante. Polamowska (198) y Adams et al (199) observaron que la agregación plaquetaria *in vitro* inducida por una gran variedad de agonistas era inhibida por la liberación de NO en cultivo fresco de células endoteliales. Este NO causaba también la desagregación del agregado plaquetario formado previamente. Por otro lado, estudios en diferentes animales han demostrado que la liberación basal de NO causada por la estimulación colinérgica y la sustancia P que inhibe la agregación plaquetaria, inducida por varios agentes agregantes como traumas endoteliales, incrementaba el tiempo de sangrado.

1.3.3.1. Síntesis de NO por la plaqueta

Por otro lado, hay recogidos diversos datos aportados por numerosos autores que han observado que las plaquetas, al igual las células endoteliales, también poseen la capacidad de generar NO, como ya se ha mencionado en el apartado anterior de este trabajo de tesis. Y es que, al igual que en el endotelio, en la plaqueta se ha demostrado la presencia de la isoenzima constitutiva NOS3 (200-203). Este NO derivado de la plaqueta está considerado como un potente regulador de la función plaquetaria. Por ende, la plaqueta es capaz de producir y liberar NO, habiéndose comprobado que la liberación basal de NO por las plaquetas *in vitro* y posiblemente *in vivo*, se encuentra alrededor de 20 nmol/L (204). La activación de NOS3 se inicia durante la adhesión de las plaquetas al colágeno de la pared del vaso sanguíneo y la agregación plaquetaria inducida por colágeno, ADP y ácido araquidónico (205-207). A pesar de que el mecanismo de esta activación no es del todo conocido, sí se afirma que el NO generado a partir de L-arginina durante dicha reacción se libera en relación con la magnitud de la activación plaquetaria. De esta manera, tanto el NO intraluminal que se libera desde el endotelio vascular como el que se libera desde la propia plaqueta, aumentan considerablemente los niveles de GMPc en el interior de las plaquetas humanas. Por ello, y en función de los datos recopilados durante los últimos años, se concluiría que la activación de la enzima NOS3, y la consecuente producción de NO sobre las plaquetas, inhibe su adhesión e induce su desagregación (208), hechos que concuerdan con lo establecido al principio de este punto, que el NO es un potente regulador de la función plaquetaria.

Retrocediendo brevemente, hay que hacer un apunte bastante importante relacionado con la disfunción endotelial. Ésta puede conducir a la adhesión de plaquetas y glóbulos blancos a las paredes vasculares y producir hiperplasia de la íntima vascular. Si a estos sitios disfuncionales se adhieren las plaquetas, se produce contracción de la musculatura lisa del vaso por acción del TxA_2 y la serotonina; este hecho estimula la proliferación y migración de células del músculo liso vascular por acción del PDGF. El NO y las prostaciclina inhiben la adhesión plaquetaria, así como la acción de la MCP-1 y la adhesión de monocitos. El GMPc inhibe la fosfolipasa C y A_2 en las plaquetas, lo que regula la función de algunos receptores de plaquetas tales como el receptor del fibrinógeno IIb/IIIa y P-selectinas.

1.3.4. EL PAPEL DE LOS INHIBIDORES DE LA NOS

1.3.4.1. Efecto modulador endógeno de los inhibidores de la NOS

Los inhibidores endógenos de la enzima NOS ejercen un poderoso efecto modulador de su actividad. Sin embargo, la disfunción de la vía endotelial de la L-arginina-NO constituye un mecanismo muy común mediante el cual muchos factores de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, hipertensión, tabaquismo, diabetes mellitus, homocisteinemia, inflamación vascular) ejercen sus efectos deletéreos en la pared vascular (209-214). En este sentido, puede existir una sobreproducción de estos inhibidores de NOS asociada a ciertas situaciones patológicas, hecho que puede contribuir a una reducción en la síntesis de NO y el consecuente desequilibrio en la vía endotelial L-arginina-NO.

1.3.4.2. La dimetilarginina asimétrica: acción y metabolismo

Como ya se ha comentado en ocasiones anteriores, entre todos estos inhibidores de la síntesis de NO se encuentra el ADMA. Se trata de un inhibidor endógeno de la enzima NOS descrito por primera vez por Vallance et al en 1992 (215) y tiene una serie de propiedades que merece la pena destacar. El ADMA tiene propiedades similares al L-NMMA y se sintetiza en las células endoteliales a partir de arginina que es metabolizada a citrulina antes de su excreción a través de la orina (Figura 18).

La actividad inhibitoria de la síntesis de NO que posee el ADMA se ha podido demostrar a través de diversos estudios experimentales. Por una parte, se han desarrollado estudios en los que se han empleado segmentos arteriales aislados e

incubados *in vitro*, en concentraciones que oscilan entre los 3 y 15 $\mu\text{mol/L}$ (215-218). Además, mediante el cultivo de macrófagos murinos también se ha podido confirmar que el ADMA es capaz de inhibir la producción vascular de NO de manera dependiente de concentración (219,220). En este sentido, el grupo de Böger et al determinó que el ADMA era capaz de producir una inhibición tanto a nivel endotelial como neuronal de la actividad de la enzima NOS mediante un mismo modo dependiente de concentración.

El ADMA se metaboliza por acción de la enzima DDAH en las células endoteliales vasculares humanas dando lugar a L-citrulina. Se han identificado dos isoformas de esta enzima, DDAH I y II, con un diferente patrón de expresión en función del tipo de tejido en el que se encuentren. Por una parte, DDAH I está presente en algunos tejidos que también expresan NOS neuronal, mientras que DDAH II se encuentra principalmente en tejidos vasculares que coexpresan NOS3, es decir, la isoforma endotelial (221). La actividad DDAH se reduce por el estrés oxidativo inducido por TNF- α o LDL oxidada *in vitro* (222) y, además, se modula a través de un mecanismo de S-nitrosilación (223).

Se ha demostrado que la inhibición de la DDAH provoca una elevación de los niveles de ADMA y es capaz de causar una vasoconstricción de anillos arteriales aislados *in vitro* (213). Por otra parte, la inhibición de la actividad de la DDAH desencadena el incremento de la generación de radical superóxido endotelial (224). En este sentido, en estudios previos se ha podido demostrar que ratones DDAH transgénicos presentan altos niveles de producción sistémica de NO, menor presión sanguínea sistémica y resistencia vascular periférica disminuida (225). A su vez, en humanos, la infusión intraarterial de ADMA en la arteria braquial disminuye de manera significativa el flujo de sangre en el antebrazo (226), aunque las concentraciones alcanzadas en la circulación local exceden de lejos a aquellas concentraciones de ADMA que pueden medirse en pacientes. Si se toman juntos los resultados de otros estudios realizados (227,228), se puede corroborar la evidencia de que, como ya se ha mencionado, el ADMA modula la actividad de la enzima NOS3 dentro de un rango de concentración encontrado en pacientes que sufren enfermedad vascular. Pero es que, por otra parte, esta evidencia sugiere que incluso las pequeñas modificaciones que se puedan producir en los niveles de ADMA pueden afectar de forma significativa la producción de NO y, por ende, el tono vascular y la resistencia vascular sistémica. En este sentido, parece lógico considerar al ADMA como un interesante marcador de disfunción endotelial.

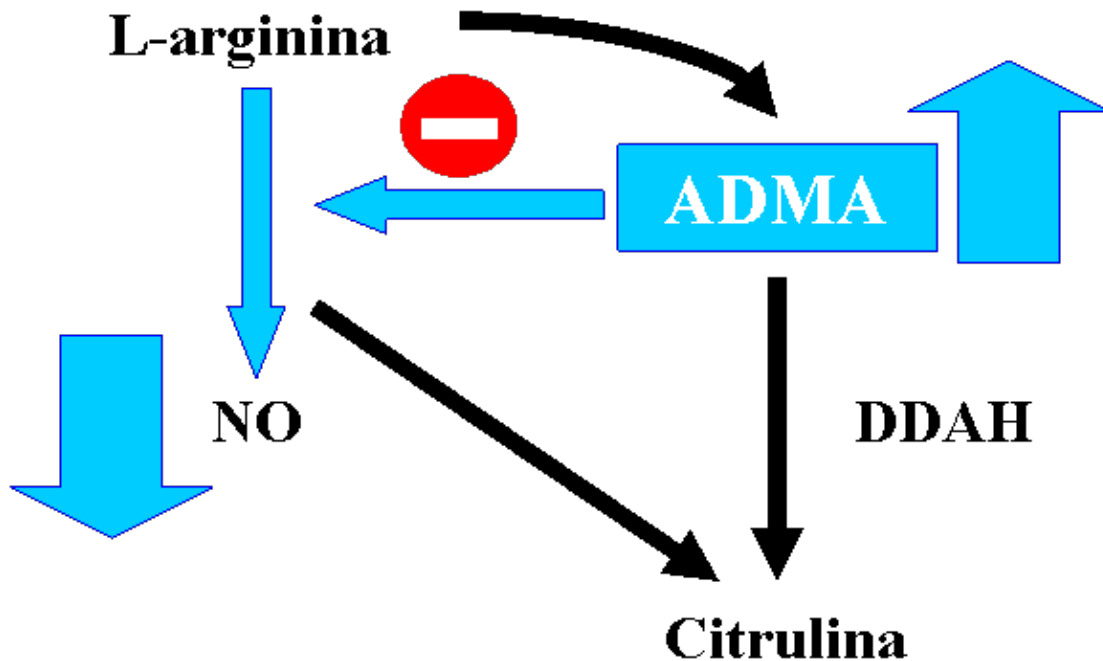


Figura 18. La dimetilarginina asimétrica (ADMA) se sintetiza a partir de L-arginina por acción de la proteína metilasa I y es metabolizada posteriormente por acción de la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) produciendo citrulina. ADMA actúa como un inhibidor de la síntesis de NO y su concentración es mayor bajo ciertas condiciones patológicas.

1.3.4.3. Mecanismos reguladores de la concentración plasmática de ADMA

Existen mecanismos reguladores de la concentración de ADMA, siendo esta molécula liberada cuando determinadas proteínas metiladas son degradadas en sus componentes aminoacídicos durante el recambio proteolítico (229). La metilación de la arginina es un mecanismo ubicuo de modificación proteica post-traslacional que ocurre en la mayoría de tipos celulares, debido a la actividad de metiltransferasas específicas (230). Sin embargo, no existen evidencias de que la L-arginina libre pueda ser metilada por la acción de estas enzimas. Una vez el ADMA es liberado como consecuencia de la degradación de proteínas, su eliminación del cuerpo se lleva a cabo o bien por vía renal o bien por inactivación enzimática, y aunque el aclaramiento renal era el primer mecanismo del que se informó para esta eliminación, la degradación del ADMA por vía enzimática por DDAH también es un mecanismo con extrema relevancia, el cual a ido despertando el interés con el paso del tiempo. Como ya habíamos mencionado, y en este

sentido, la enzima DDAH se encarga de degradar el ADMA a dimetilamina y L-citrulina.

1.4. CONSIDERACIONES

Para finalizar esta introducción tenemos que hacer caso de los resultados obtenidos en estudios previos, a través de los que se ha llegado a una conclusión: la aspirina, además de en los leucocitos y en las células endoteliales, también estimula la actividad de la enzima NOS3 en las plaquetas, produciendo un incremento en la producción de NO y favoreciendo los efectos antiplaquetarios del fármaco. Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, una pregunta que queda por responder es si la producción de NO por las plaquetas puede estar asociada con la respuesta de éstas a aspirina. En este punto, sería aún más interesante formular una nueva cuestión: ¿La diferente respuesta de las plaquetas a un fármaco como la aspirina puede estar asociada a la diferente capacidad de las mismas para producir NO? Estas dos preguntas son el motivo fundamental de este trabajo de tesis doctoral.

En este sentido, el conocimiento de la regulación normal de la función plaquetaria puede permitir el establecimiento de nuevos mecanismos según los cuales la actividad plaquetaria en los vasos sanguíneos enfermos puede ser controlada y reducir así el riesgo de aterosclerosis. Al examinar los procesos de señalización y comprender los mecanismos moleculares de interacción entre plaquetas, sería posible identificar moléculas o grupos de moléculas que serían potenciales objetivos para el tratamiento terapéutico o para ser utilizados como biomarcadores. En esta tesis doctoral intentamos abrir un nuevo mecanismo asociado al síndrome de resistencia a aspirina, introduciendo nuevos datos moleculares relacionados con esta condición. En este sentido, con los resultados de esta tesis se establece una relación entre las plaquetas sensibles y resistentes a aspirina y el contenido de proteína NOS3 fosforilada en el residuo de Ser 1177.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS

Como ya se ha explicado en la introducción de esta tesis doctoral, existe todo un conocimiento alrededor del efecto antiplaquetario que posee la aspirina inhibiendo la producción de TxA_2 y la respuesta insuficiente que poseen las plaquetas de algunos pacientes frente a la acción de este fármaco. Además, está bien reconocido que el efecto antiplaquetario de aspirina no puede únicamente explicarse a través de su habilidad para inhibir la síntesis de TxA_2 sino que tienen que existir otros mecanismos. Entre estos mecanismos se demostró hace unos años que el NO tiene un papel relevante. La plaqueta es una célula que contiene la maquinaria energética necesaria para generar NO ya que expresa la enzima NOS de tipo endotelial o según la nomenclatura, NOS3.

No todos los pacientes sometidos a tratamiento con aspirina se benefician por igual de este fármaco. Es también conocido que casi un 20 % de los pacientes que toman aspirina presentan plaquetas que no son inhibidas por ella. Incluso, si los pacientes son diabéticos, este porcentaje crece hasta casi un 40 %.

Existen muchos mecanismos que han intentado explicar por qué las plaquetas de algunos pacientes no son suficientemente inhibidas por aspirina. Entre estos mecanismos destacan desde el cumplimiento del tratamiento hasta factores genéticos o la existencia de moléculas circulantes que impiden la acción de aspirina sobre las plaquetas. Sin embargo, en esta tesis hipotetizamos que entre estos mecanismos podría encontrarse una incapacidad en la producción de NO por parte de las plaquetas resistentes a aspirina que no existiría en las plaquetas que son plenamente inhibidas por este fármaco.

3. OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis fueron:

1. Analizar si las plaquetas resistentes a aspirina tienen una capacidad diferente de generar NO con respecto a plaquetas sensibles.
2. Determinar si el nivel de expresión de NOS3 es diferente en las plaquetas sensibles y resistentes a aspirina.
3. Determinar si existe una causa genética que explique una diferente expresión de NOS3 en las plaquetas sensibles y resistentes a aspirina.
4. Determinar si podría existir una diferente capacidad de fosforilación de la NOS3 en las plaquetas sensibles y resistentes a aspirina.
5. Analizar si la estimulación in vitro de las plaquetas es diferente si estas son sensibles y resistentes a aspirina y su posible asociación con su capacidad de generar NO.
6. Determinar si la estimulación in vitro de plaquetas sensibles y resistentes a aspirina induce una diferente fosforilación en la NOS3 y si este fenómeno se puede asociar con un grado diferente de estimulación plaquetaria.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1. INCLUSIÓN DE PACIENTES

Para realizar el estudio, se incluyeron 50 pacientes con isquemia coronaria establecida, los cuales fueron reclutados. Los pacientes estaban sometidos a tratamiento con 100 mg de aspirina desde al menos 9 meses antes y no tenían otro tratamiento antiplaquetario ni antiinflamatorio. Estos pacientes fueron clasificados en dos grupos, un grupo resistente a aspirina (n=24) y por otra, un grupo sensible a aspirina (n=26). La resistencia a aspirina se evaluó basándose en la funcionalidad plaquetaria de acuerdo con el test PFA-100. La ocurrencia de un evento cardiovascular agudo al menos durante los nueve meses previos se consideró como criterio de exclusión. Por otro lado, como hemos señalado, también se excluyó a aquellos pacientes que estuviesen bajo tratamiento con otros fármacos antitrombóticos o con antiinflamatorios no esteroideos durante los treinta días previos a la inclusión, o bajo terapia de nitratos. Otros criterios de exclusión de los pacientes fueron: la existencia de trombocitopenia, anemia o unos niveles plasmáticos de creatinina iguales o superiores a 2mg/dL.

4.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción antecubital en tubos con citrato, por la mañana, de 2 a 4 horas después de la toma de la dosis de aspirina. Se descartaron los 3 o 4 mL iniciales de sangre, con el objetivo de reducir la activación plaquetaria espontánea (Figura 19). Además, se recogieron 5 mL adicionales de sangre en tubos con EDTA para el aislamiento tanto de plasma como de glóbulos blancos sanguíneos.



Figura 19. Tubos de citrato para la recogida de las muestras sanguíneas

El estudio que ha dado lugar a esta tesis doctoral se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki. La Declaración establece unos principios básicos, tanto el respeto por el individuo (Artículo 8) como su derecho a la autodeterminación y el derecho a tomar decisiones informadas (consentimiento informado) (Artículos 20, 21 y 22). En este sentido, se incluye también la participación del propio paciente en la investigación, tanto al inicio como durante el curso de la misma. Por ende, el deber del investigador solo es hacia el paciente (Artículos 2, 3 y 10) o el voluntario (Artículos 16 y 18) y, mientras exista necesidad de llevar a cabo una investigación (Artículo 6), el bienestar del sujeto ha de ser dominante sobre los intereses de la ciencia o de la sociedad (Artículo 5). Las consideraciones éticas deben venir siempre del análisis precedente de las leyes y regulaciones (Artículo 9). En este sentido, todos los pacientes incluidos dieron su consentimiento para formar parte del estudio. Por otro lado, el estudio fue aprobado además por el Comité Local de Ética del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A ASPIRINA

Como ya se ha mencionado con anterioridad, los pacientes resistentes a aspirina se identificaron mediante la utilización del ensayo PFA-100 (Dade Behring W. Sacramento, USA). Este test se ha usado para predecir la recurrencia clínica en pacientes con tratamiento con aspirina (231). Este sistema emplea cartuchos con membrana recubierta de colágeno infundida con 10 µg de epinefrina (232,145). La sangre que previamente se ha obtenido en los tubos con citrato es aspirada a través de una aguja que la somete a unas elevadas condiciones de flujo (5000 a 6000 s⁻¹) a través de una pequeña apertura de 150 µm presente en la membrana de cada uno de estos cartuchos. Por tanto, al infundir la sangre en el cartucho se produce una oclusión del poro, que transcurre en el denominado TC. En este sentido, este TC es un indicador de la función plaquetaria en la muestra de sangre total obtenida. De acuerdo con las especificaciones ofrecidas por el fabricante, un rango de 94 a 103 segundos con cartuchos de epinefrina define la presencia de plaquetas resistentes a aspirina (233,151). En las plaquetas sensibles a aspirina el TC es mayor. Una vez transcurridos 300 segundos, el proceso finaliza de forma automática.

Es importante señalar que, como se ha podido ver en otros estudios (232,145), para descartar el efecto de no adherencia al tratamiento en la falta de respuesta de las plaquetas a aspirina, el test PFA-100 se realizó en el momento de la inclusión y una hora después de que el paciente recibiese una dosis adicional de 100 mg de aspirina. Por esta razón, sólo aquellos pacientes que mostraron un TC similar en ambas mediciones se consideraron para el estudio.

4.4 AISLAMIENTO DE PLAQUETAS Y EVALUACIÓN DE LA PUREZA

Las muestras de sangre total obtenidas en tubos de citrato se centrifugaron a 1000 rpm durante 15 minutos a una temperatura establecida de 20° C. El PRP obtenido tras la centrifugación fue recuperado y dividido en alícuotas que contenían $1,25 \times 10^8$ plaquetas. El volumen final fue posteriormente ajustado a 500 μ L con medio RPMI-1640 sin rojo fenol. Las plaquetas fueron entonces incubadas a 37° C durante 20 minutos con agitación continua mediante barra magnética a 1000 rpm. Tras la incubación, se centrifugaron los PRPs a 2500 rpm a 4° C, lo que permitió obtener y separar un sobrenadante y un pellet de plaquetas. Hasta la realización de las determinaciones bioquímicas y de biología molecular, sobrenadantes y pellets permanecieron almacenados y congelados a -80° C.

La pureza de las plaquetas en las muestras de PRP fue evaluada mediante ensayos de citometría de flujo. Para este propósito, el PRP fue incubado con anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína dirigidos contra CD61 (130-081-501, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), CD45 (5450-PE100T, BioCytex, Marseille, France) y CD235-A (340947, Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA), que identifican plaquetas, leucocitos y eritrocitos, respectivamente. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA).

4.5. NITRITOS Y NITRATOS LIBERADOS DESDE LA PLAQUETA

Una de las determinaciones bioquímicas a las que se sometieron las muestras fue la cuantificación de la concentración conjunta de nitratos y nitritos liberados por la

plaqueta al medio RMPI 1640 sin rojo fenol en el que fueron previamente incubadas. Por esta razón, la medida se realizó en los sobrenadantes plaquetarios que se habían obtenido y almacenado. Para ello se utilizó un ensayo colorimétrico (78001, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo tenía una sensibilidad de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ y, a su vez, los coeficientes de variación intra e inter-ensayo eran 2,7 y 3,7%, respectivamente.

4.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NOS2, NOS3 Y NOS3 FOSFORILADA EN SERINA 1177 MEDIANTE WESTERN-BLOT.

La cantidad de enzimas NOS2 y NOS3, así como la fosforilación en el residuo Ser 1177 de la NOS3, se determinó mediante Western blot. Para este propósito, las plaquetas fueron inicialmente homogenizadas en un buffer que contenía Tris/HCl 25 mM con un pH de 7,8, sacarosa 0,25 M y EDTA 1 mM, todo ello solubilizado en un tampón Laemmli que contiene 2-mercaptoethanol. A continuación, las proteínas obtenidas de esta forma se cargaron en varios geles al 10% de poliacrilamida en presencia de SDS para crear unas condiciones desnaturalizantes. La cantidad de proteína plaquetaria total que se cargó en el gel para su separación electroforética fue de 20 μg , valor que se estimó mediante el reactivo BCA (Pierce), método basado en una modificación del método de Lowry: Pierce, Rockford, IL, USA; Pierce, Illinois). De forma paralela, se cargaron geles que servirían para la determinación del nivel de expresión de la proteína β -actina, utilizada como control de carga.

Una vez hubo finalizado la electroforesis, las proteínas separadas en los distintos geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Immobilion-P; Millipore) que tiempo después fueron bloqueadas con una solución de albúmina al 5% en tampón PBS-Tween, manteniéndose así durante toda la noche a 4° C. Transcurrido el tiempo de bloqueo, se procedió a la incubación de estas membranas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la enzima NOS3 (sc-653, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA, dilución 1:500), NOS2 (sc-8310, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilución 1:1500), la forma fosforilada NOS3-Ser 1177 (804-396C100 Alexis Biochemical, California USA, dilución 1:1000) y β -actina (A-5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, dilución 1:1000), respectivamente.

Tras las incubaciones de las membranas de nitrocelulosa con sus anticuerpos correspondientes, se procedió al revelado con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano. En este sentido, los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti-conejo IgG (1:2500 para NOS3 y NOS2) y anti-ratón IgG (1:1500 para NOS3 Ser 1177 y 1:7500 para β -actina). La existencia de señal de expresión proteica se reveló mediante el empleo de reactivos potenciadores de luminiscencia (ECL; GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) y fue detectada mediante un equipo transiluminador (Gel Logic 440 Imagin System, Kodak, USA). Tras el revelado y detección, la expresión de las proteínas fue cuantificada a través de un análisis por densitometría (Quantity One Software, Bio-Rad). Para determinar el peso molecular de las proteínas en estudio se utilizaron proteínas marcadas.

4.7. DETERMINACIÓN DE LA ALTERACIÓN GENÉTICA T-786 \rightarrow C EN EL GEN NOS3

Se extrajo el ADN genómico de las células blancas de los sujetos sometidos a estudio, siguiendo una técnica de rutina que empleamos a diario en nuestro laboratorio (234). La región 5'-flanqueante del gen NOS3 fue amplificada mediante PCR. La secuencia de los cebadores que se emplearon para el desarrollo de esta reacción fue: delantero: 5'-GTGTACCCCACTCGCATTTTC-3'; reverso: 5'-GGGACACAAAAGAGCAGGAA-3'. Esta PCR se realizó bajo unas condiciones específicas: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, un anillamiento de 1 minuto a 52°C y una extensión de 1 minuto a 72°C. Terminada la PCR, los productos se purificaron utilizando un kit comercial (Ultra Clean PCR Clean-up ADN purification kit, Carlsbad, CA) y se secuenciaron con química Big-Dye terminator en ambas direcciones de la secuencia utilizando un secuenciador ABI PRISM 310 Automatic ADN (Applied Biosystems, Foster City, CA).

4.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ADMA EN EL PLASMA DE LOS SUJETOS INCLUIDOS

Los niveles de ADMA en el plasma se determinaron utilizando un kit comercial ELISA (Diagnostika GMBH, Hamburg Germany) siguiendo punto por punto las recomendaciones del fabricante. Este ensayo tiene una sensibilidad de 0,05 $\mu\text{mol/L}$. Los coeficientes de variación inter e intraensayo eran de 9,4 % y 6,0 %, respectivamente.

4.9. INDUCCIÓN IN VITRO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN RESPUESTA A COLÁGENO

El PRP fue obtenido de un subgrupo nuevo adicional de pacientes sensibles (n=10) y resistentes (n=10) a aspirina. El PRP fue sometido a agregación *in vitro* inducida por colágeno, un agente inductor de la agregación plaquetaria inhibible por aspirina. La agregación plaquetaria se registró gracias a un lumiagregómetro (Aggrecoorder, dos canales). El PPP se utilizó como control de transmisión del 100% de luz. El volumen de PRP, conteniendo $1,25 \times 10^8$ plaquetas, se ajustó a 600 μL con PPP y se incubó en el agregómetro a 37°C durante 20 min con agitación continua mediante imán (1000 rpm). Después de este tiempo, se retiró una alícuota (100 μL) para determinar la concentración de nitrito+nitrato. Esta alícuota se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se congelaron separados los sobrenadantes y los pellet a -80°C.

Los 500 μL restantes de PRP se estimularon con unas concentraciones submáximas de colágeno (0.5, 1.5 and 3.5 $\mu\text{g/mL}$) de forma acumulativa durante 20 minutos. Estas concentraciones fueron elegidas habiéndonos basado en una observación previa que mostraba ese diferente grado de cambio en la transmisión de la luz entre las plaquetas respondedoras a Aspirina y las no respondedoras (125). Después de la incubación con colágeno, el PRP recuperado se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4° C y el sobrenadante y pellet se congelaron a -80° C con el fin de determinar el contenido en nitrato+nitrito y NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177, respectivamente.

4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores aparecen expresados como la media \pm EEM (Se utilizó un test de Mann-Whitney para poder comparar las variables continuas entre los dos grupos experimentales).

La asociación ajustada entre los parámetros bioquímicos con la respuesta de la plaqueta a aspirina se analizó a través de un modelo de regresión logística condicional con la resistencia a aspirina como variable dependiente y el tratamiento con IECAs como covariable.

Las correlaciones se realizaron mediante un análisis de Pearson. El análisis estadístico se ejecutó con el programa informático SPSS 15.0. Un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

La tabla 2, que se muestra a continuación en esta tesis, resume las características clínicas de los pacientes con plaquetas resistentes y sensibles a aspirina. Sólo aquellos pacientes con valores extremos de TC para cada una de las dos condiciones de respuesta aspirina se incluyeron en el estudio. TC es el tiempo necesario para la oclusión de la apertura del poro en el cartucho de PFA-100 y es un indicador de la función plaquetaria. El límite superior del test PFA-100 es 300 segundos. Los resultados de las variables categóricas están representadas como el número de casos con respecto al total de pacientes incluidos dentro de cada grupo experimental. La edad se representa como la media \pm EEM. Los pacientes de ambos grupos mostraban edades similares. Del mismo modo, la proporción de hombres y mujeres era similar, con la salvedad de que las dos únicas mujeres se incluyeron en el grupo resistente a aspirina. En este mismo sentido, se mantenían unas proporciones semejantes tanto en la condición de hipertensión como de hiperlipemia. Sin embargo, sí se observó que el mayor porcentaje de individuos diabéticos se hallaba en el grupo resistente. Los tratamientos farmacológicos concomitantes, entre los que se consideraron la aspirina, los β -bloqueantes, inhibidores IECAs, estatinas y diuréticos, también registraron valores semejantes en ambos grupos de pacientes.

Tabla 2. Características clínicas y tratamiento farmacológico de pacientes con plaquetas sensibles y resistentes a aspirina.

<i>Parámetro</i>	Sensibles a aspirina	Resistentes a aspirina
	(n = 26)	(n = 24)
<i>Edad (años)</i>	65,4± 1,9	68,7± 1,5
<i>Género (Hombre/mujer)</i>	26/0	22/2
<i>Valores TC (s)</i>	> 300	124,8 ± 7,1
<i>Hipertensión n (%)</i>	16 (61,5)	13 (54,1)
<i>Hiperlipemia n (%)</i>	15 (57,7)	14 (58,3)
<i>Diabetes mellitus n (%)</i>	6 (23,1)	9 (37,5)
<i>Tratamientos farmacológicos concomitantes</i>		
<i>Aspirina (%)</i>	26 (100)	24 (100)
<i>β-bloqueantes (%)</i>	18 (69,2)	18 (75,0)
<i>Inhibidores ECA n (%)</i>	15 (57,7)	6 (25,0)*
<i>Estatinas (%)</i>	26 (100)	24 (100)
<i>Diuréticos (%)</i>	7 (26,9)	7 (29,1)

Los pacientes con plaquetas resistentes y sensibles a aspirina mostraron una historia clínica de factores de riesgo cardiovascular similar. Sin embargo, sí se observa que un número mucho mayor de pacientes con plaquetas sensibles a aspirina estuvieron bajo tratamiento con IECAs en comparación con aquellos con plaquetas resistentes a aspirina. Otros tratamientos farmacológicos fueron similares entre los dos grupos experimentales (Tabla 2).

La pureza de las muestras de plaquetas se evaluó mediante un citómetro de flujo. La Figura 21 ilustra un análisis de citometría representativo según el tamaño y marcaje positivo de CD61⁺ (plaqueta marcada), CD45⁺ (leucocito marcado) y CD235-A⁺ (eritrocito marcado). Los eritrocitos y leucocitos constituían menos del 0,05% de la muestra de PRP y más del 99,7% estaba constituido por plaquetas (Figura 20).

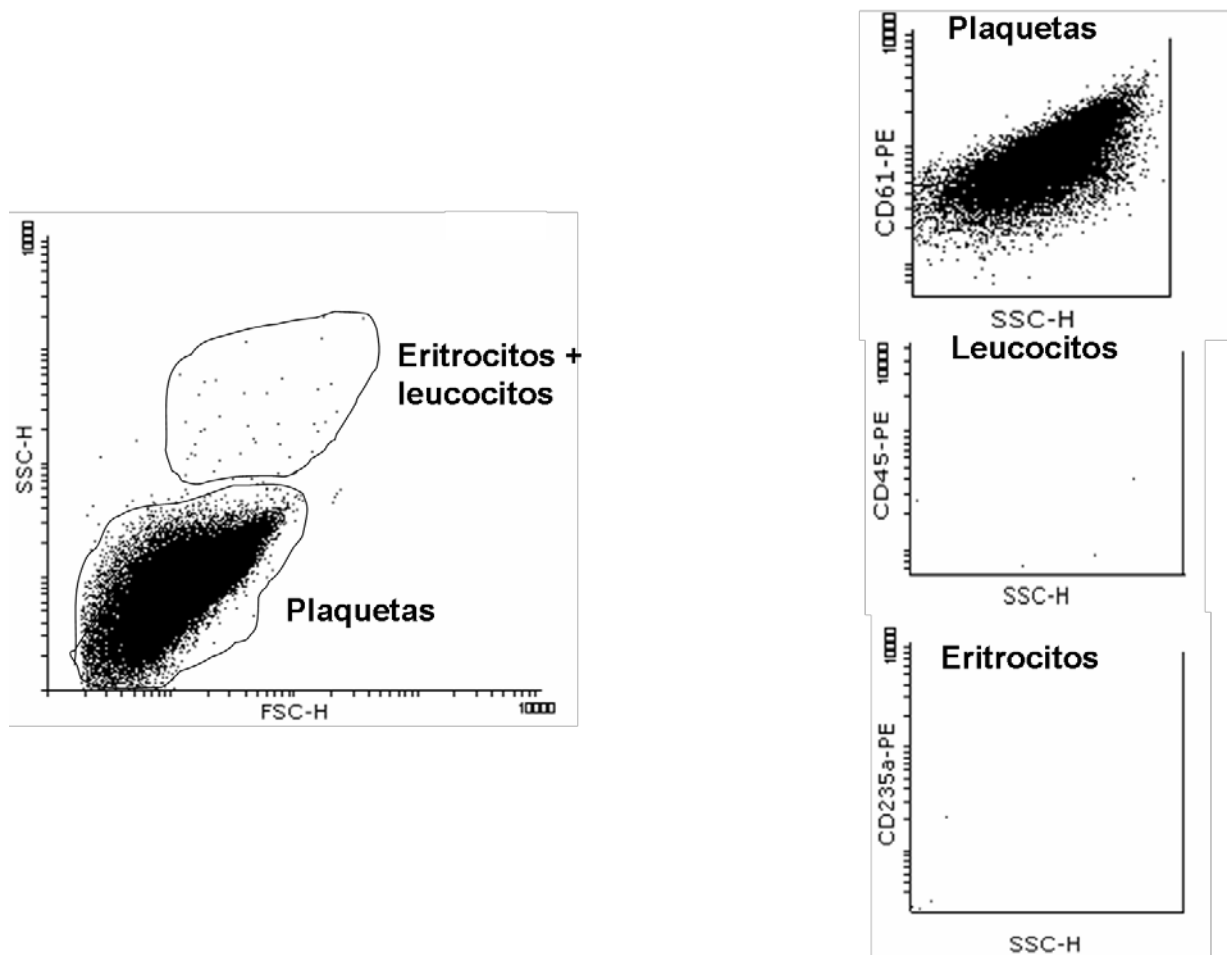


Figura 20. Análisis por citometría de flujo de plaquetas, leucocitos y eritrocitos en el PRP. A la izquierda, una gráfica representativa de citometría de flujo para detectar la población plaquetaria según tamaño y complejidad. A la derecha, gráficas representativas de citometría de flujo para detectar CD61, CD45 y CD235a en el PRP, marcadores específicos de plaquetas, leucocitos y eritrocitos, respectivamente.

5.1. PRODUCCIÓN DE NITRITOS + NITRATOS Y EXPRESIÓN DE NOS2 Y NOS3 EN LA PLAQUETA

Se pudo observar que en los sobrenadantes procedentes de las plaquetas sensibles a las plaquetas, la cantidad detectada de nitrato+nitrito tenía una tendencia a ser mayor que en aquellos que procedían de plaquetas aspirina-sensibles. Sin embargo, esta tendencia no suponía una diferencia estadísticamente significativa (nitrito + nitrato en $\mu\text{mol/L}$: aspirina-sensible: $15,49 \pm 2,65$, aspirina-resistente: $11,63 \pm 2,40$; $p=0,09$). Este hallazgo no se veía modificado tras el ajuste estadístico para tratamiento con IECAs, puesto que el valor de p obtenido en el análisis estadístico fue de 0,315.

Por otra parte, se encontró una expresión de proteína NOS3 significativamente mayor en las plaquetas sensibles a aspirina que en las plaquetas resistentes (Figura 21). La mayor expresión de NOS3 en las plaquetas aspirina-sensibles era independiente del tratamiento con IECAs puesto que la expresión de NOS3 permanecía mayor en las plaquetas sensibles a aspirina que en las resistentes cuando la expresión de NOS3 fue ajustada por el tratamiento con IECAs en el modelo de regresión lineal ($p=0,049$).

El análisis de Pearson demostró una correlación negativa entre los niveles de expresión de la proteína NOS3 en las plaquetas y los valores de tiempo de coagulación en el ensayo PFA-100, obteniéndose un coeficiente de Pearson de -0,3 y un valor p de 0,048.

En las plaquetas, el nivel de expresión de la proteína NOS2 fue bastante débil y no se encontraron diferencias entre los dos grupos en estudio (Figura 21). La expresión de β -actina se utilizó como control de carga de proteína.

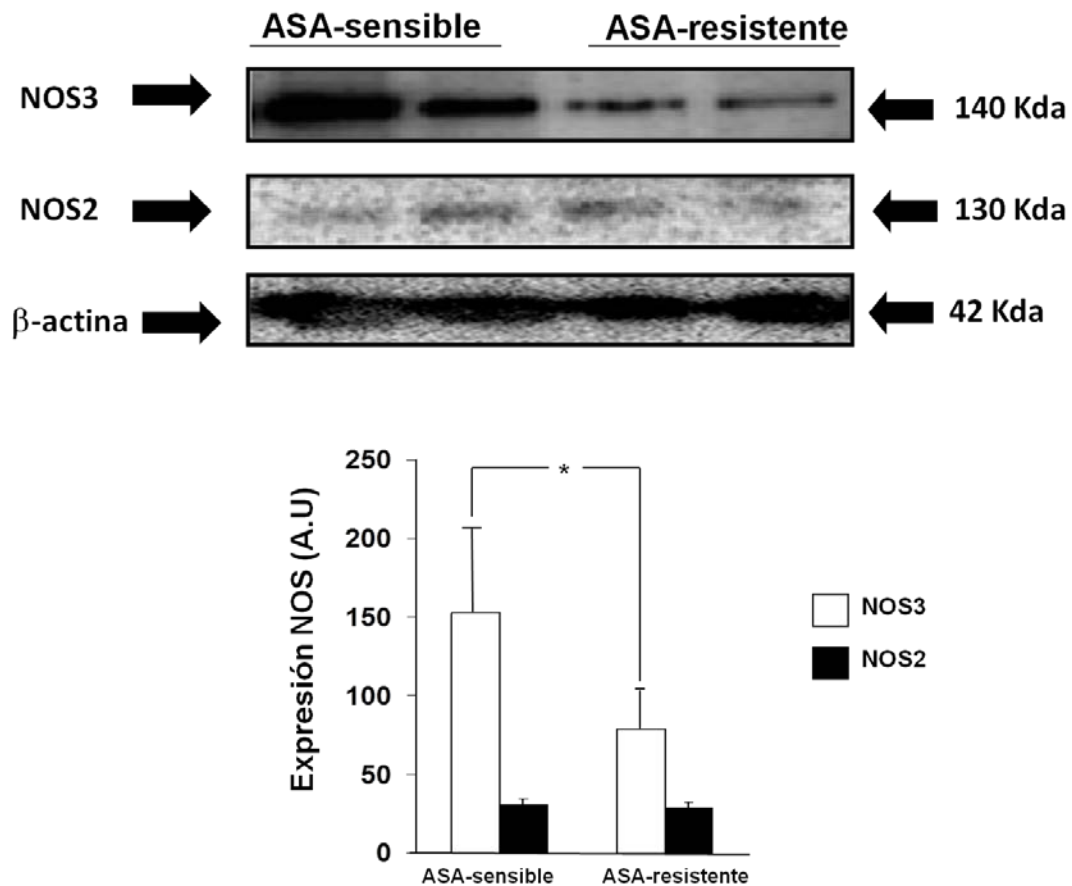


Figura 21. Expresión de las proteínas NOS2 y NOS3 de las plaquetas de pacientes sensibles y resistentes a aspirina. Las barras del gráfico muestran el análisis densitométrico de todos los Western blots representados en unidades arbitrarias (U.A.). Los resultados son la media \pm EEM. * $p < 0,05$ con respecto a ASA-sensible.

5.2. PRESENCIA DE LA ALTERACIÓN -786 (T⁻⁷⁸⁶ \rightarrow C) EN EL GEN NOS3

La secuenciación de nucleótidos en el gen NOS3 en la posición -786 reveló que la mayoría de los pacientes mostraban homocigosis para el alelo CC y no existían diferencias entre los pacientes con plaquetas sensibles y resistentes a aspirina (Tabla 3). Además, como puede apreciarse en los datos recogidos en la tabla 3, se registró un número similar de pacientes sensibles y resistentes a aspirina que mostraban alelos TT y TC en posición -786 en el gen NOS3 (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia nucleotídica en posición -786 en la región flanqueante 5' del gen NOS3.

	Gen NOS3, mutación -780 T>C			
	CC	TC	TT	Total
<i>Plaquetas resistentes a aspirina</i> (n=24)	14	7	3	24
<i>Plaquetas sensibles a aspirina</i> (n=26)	14	7	5	26

5.3. EL CONTENIDO PLAQUETARIO DE NOS3 FOSFORILADA EN EL RESIDUO Ser 1177

Existen diferentes estudios que han demostrado la asociación existente entre la fosforilación en posición Ser 1177 de la NOS3 y la mayor actividad de esta enzima. En nuestro estudio, el contenido plaquetario de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 fue significativamente mayor en las plaquetas sensibles a aspirina en comparación con las plaquetas resistentes (Figura 22). Este hecho también fue evidente cuando el contenido de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 se calculó como la relación con la cantidad total de NOS3 expresada en las plaquetas sensibles y resistentes a aspirina, respectivamente (Figura 22). Tras el ajuste por tratamiento con IECAs, el nivel de NOS3 Ser 1177 fue también significativamente mayor en las plaquetas sensibles a aspirina que en las resistentes a aspirina, obteniéndose un valor $p = 0,04$.

El análisis de Pearson mostró una correlación positiva entre los valores del tiempo de coagulación (TC) en el ensayo PFA-100 y el contenido plaquetario de NOS3 Ser 1177 (Coeficiente de Pearson: 0,546; $p=0,035$).

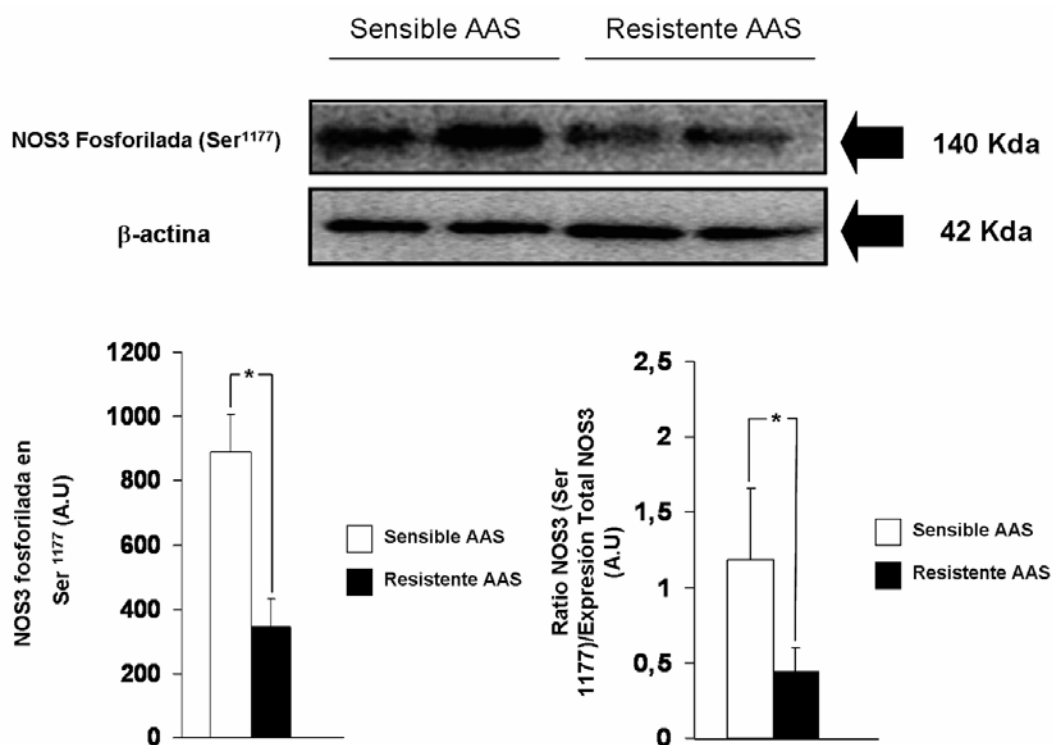


Figura 22. Representación del contenido en NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177.

5.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE ADMA

Se pudo ver que, en plasma, los niveles de ADMA, inhibidor de la síntesis de NO, no eran diferentes entre pacientes con plaquetas sensibles y resistentes a aspirina (ADMA en $\mu\text{mol/L}$: sensibles a aspirina: $0,28 \pm 0,02$, resistentes a aspirina: $0,25 \pm 0,02$; pNS). La ausencia de diferencias en los niveles plasmáticos de ADMA también se mantenía al realizar el ajuste estadístico por tratamiento con IECAs, obteniéndose un valor $p=0,456$. Además, al realizarse el análisis de Pearson se demostró la falta de asociación entre los niveles plasmáticos de ADMA y los valores del tiempo de coagulación en el ensayo PFA-100, registrándose un coeficiente de Pearson de 0,086 con un valor $p=0,557$.

5.5. CAMBIOS EN LA TRANSMISIÓN DE LUZ, LIBERACIÓN DE NITRATOS + NITRITOS Y CONTENIDO DE NOS₃ FOSFORILADA EN EL RESIDUO Ser 1177 EN PLAQUETAS ESTIMULADAS POR COLÁGENO

En la tabla 4 de esta tesis doctoral se recogen las características clínicas de un grupo adicional de pacientes que fueron reclutados. Estos pacientes tenían también isquemia coronaria establecida, los cuales fueron reclutados con posterioridad. Tras la obtención de plaquetas de estos pacientes, éstas se clasificaron mediante el test PFA-100, ya mencionado en ocasiones anteriores, en sensibles a aspirina (n=10) y resistentes a aspirina (n=10). Los PRPs obtenidos de ambos grupos se estimularon in vitro con concentraciones crecientes de colágeno.

Tabla 4. Características clínicas y tratamiento farmacológico de pacientes sensibles y resistentes a aspirina bajo estimulación *in vitro* con colágeno.

<u>Parámetro</u>	Sensibles a aspirina (n=10)	Resistentes a aspirina (n=10)
Edad (años)	65,6± 1,5	69,1± 1,2
Género (Hombre/mujer)	10/0	10/0
Valores TC (s)	> 300	109,3 ± 12,5
Hipertensión (%)	6 (60,0)	4 (40,0)
Hiperlipemia (%)	6 (60,0)	5 (50,0)
Diabetes mellitus (%)	2 (20,0)	4 (40,0)
<u>Tratamiento farmacológico</u>		
Aspirina (%)	10 (100)	10 (100)
β-bloqueantes (%)	7 (70,0)	9 (90,0)
IECAs (%)	6 (60,0)	3 (30,0)
Estatinas (%)	10 (100)	10 (100)
Diuréticos (%)	1 (10,0)	2 (20,0)

En este sentido, en las plaquetas sensibles a aspirina, la adición de cantidades crecientes de colágeno, de 0.5 hasta 3.5 µg/mL, no modificó el nivel de transmisión de luz en el agregómetro, lo que podría sugerir que no existió respuesta agregante por parte de la plaqueta al colágeno (Tabla 5).

Tabla 5. Cambios en la transmisión de luz y liberación de nitrato+nitrito en plaquetas estimuladas por colágeno. Los resultados se representan como la media \pm EEM. *

P<0.05 con respecto al basal correspondiente.

	% Transmisión de luz				Liberación de Nitrito+nitrato ($\mu\text{mol/L}$)	
	Basal	Colágeno 0,5 $\mu\text{g/ mL}$	Colágeno 1,5 $\mu\text{g/ mL}$	Colágeno 3,5 $\mu\text{g/ mL}$	Basal	Colágeno 3,5 $\mu\text{g/ mL}$
<i>Sensible aspirina (n=10)</i>	0	0,88 \pm 0,51	0,59 \pm 0,35	0,88 \pm 0,58	13,04 \pm 2,38	22,11 \pm 4,01*
<i>Resistente aspirina (n=10)</i>	0	10,91 \pm 2,81*	11,85 \pm 2,51*	14,11 \pm 3,25*	11,80 \pm 2,44	12,33 \pm 2,89

Sin embargo, en las plaquetas resistentes a aspirina, cantidades submáximas de colágeno redujeron la transmisión de la luz en el PRP, sugiriendo que las plaquetas resistentes a aspirina eran más sensibles a colágeno que las plaquetas sensibles (Tabla 5).

Como se había observado con anterioridad, en ausencia de colágeno, es decir, en condiciones basales, la cantidad de nitratos+nitritos liberados desde las plaquetas sensibles a aspirina no era diferente a la liberada por las plaquetas resistentes a aspirina (Tabla 5). Durante la estimulación con colágeno a la concentración de 3,5 $\mu\text{g/mL}$ las plaquetas aspirina-sensibles liberaban cantidades significativamente mayores de nitratos+nitritos que las observadas antes de la adición de este agente estimulante de plaquetas (Tabla 5). Sin embargo, en las plaquetas resistentes a aspirina, la adición de colágeno fracasaba a la hora de modificar la liberación de nitratos+nitritos con respecto a las mediciones realizadas antes de la adición del mismo (Tabla 5).

En las plaquetas sensibles a aspirina, el colágeno, a una concentración de 3,5 $\mu\text{g/mL}$, aumentó de manera significativa ($p=0,032$) el contenido plaquetario de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 al compararlo con las cantidades observadas antes de añadir colágeno (Figura 23). Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 23, en

las plaquetas resistentes a aspirina, el colágeno (3,5 $\mu\text{g/mL}$) aumentó sólo ligeramente el contenido plaquetario de NOS3 Ser 1177 fosforilada al compararlo con los niveles observados antes de la estimulación con colágeno y no se observaba que alcanzase significación estadística con respecto a la situación basal sin colágeno ($p=0,568$).

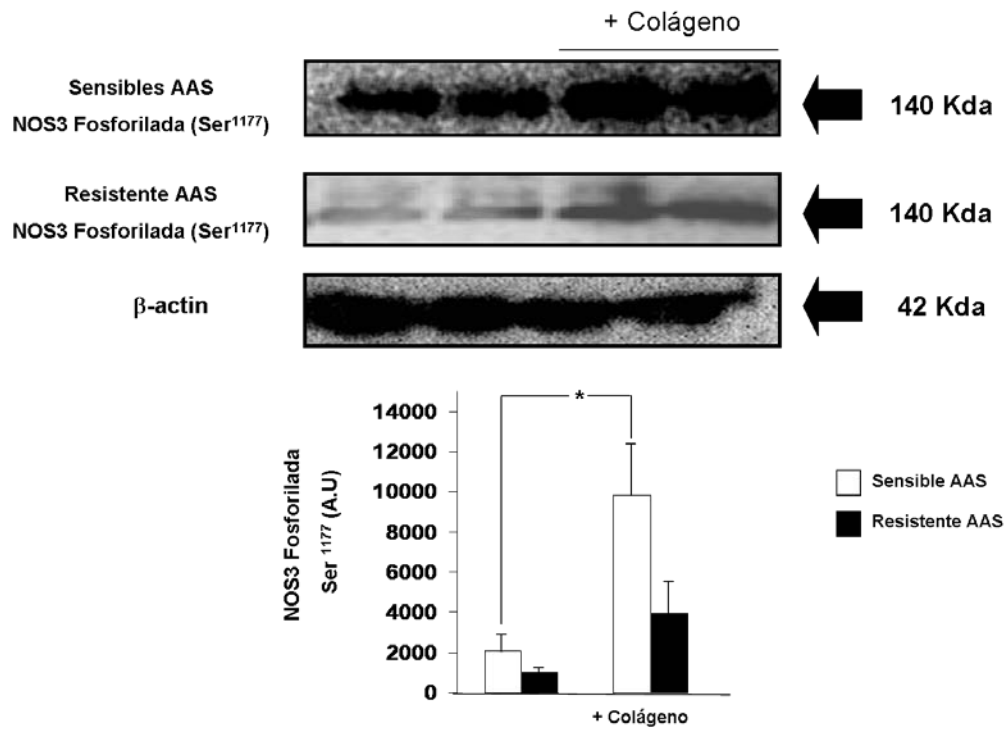


Figura 23. Representación del contenido en NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 antes y después de la estimulación con colágeno.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

En nuestro conocimiento, el trabajo de esta tesis doctoral muestra por primera vez los diferentes hallazgos en relación a la capacidad de las plaquetas de generar NO en relación a su respuesta a aspirina. Por ello, antes de comenzar la discusión de los resultados, paso a identificar los hallazgos que he considerado más relevantes y que permitirán al lector seguir mejor el desarrollo de la discusión.

1) Las plaquetas respondedoras a aspirina muestran cantidades mayores de proteína NOS3 que las resistentes a la acción de este fármaco.

2) El contenido plaquetario de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177, una forma activa de la enzima NOS3 humana, fue mayor en las plaquetas sensibles a aspirina que en las resistentes.

3) El mayor contenido de NOS3 Ser 1177 se asocia positivamente con la respuesta funcional de las plaquetas a aspirina.

4) En condiciones basales, las plaquetas sensibles y resistentes a aspirina producen cantidades similares de NO.

5) Durante la estimulación *in vitro* con colágeno de las plaquetas sensibles a aspirina, la liberación de NO y el contenido de NOS3 Ser 1177 fosforilada fue significativamente mayor que la observada en las plaquetas resistentes a aspirina tras estimulación con colágeno.

6) El contenido aumentado de NOS3 Ser 1177 en las plaquetas sensibles a aspirina estimuladas por colágeno se relacionaba con la supresión de la respuesta agregante a colágeno.

7) En las plaquetas resistentes a aspirina, se mantuvo la existencia de agregación plaquetaria en presencia de colágeno.

8) Durante esta agregación por colágeno de las plaquetas resistentes a aspirina, ni la liberación de nitratos+nitritos ni el contenido plaquetario de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 fueron significativamente modificados.

6.1. Acción reguladora del NO sobre la actividad plaquetaria

Un número elevado de estudios han demostrado que la aspirina estimula la producción de NO en diferentes tipos celulares, entre ellos, las plaquetas (85,170). Entre todos estos estudios destacarían especialmente las incubaciones de PRP con una dosis de 80 µg de aspirina realizadas por Chakrabort et al, quienes demostraron que la aspirina además de reducir la activación plaquetaria también estimulaba la producción simultánea de NO en las plaquetas como consecuencia de la síntesis de prostaglandinas. Por tanto, se describía que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por compuestos como el ibuprofeno o el ácido salicílico, o la propia aspirina, resultaba en la síntesis de NO por parte de las plaquetas (83,164). El papel del NO en el efecto antiplaquetario de la aspirina ya había sido previamente demostrado por nuestro grupo de investigación. En este sentido, demostramos como la aspirina estimula la producción de NO por los neutrófilos inhibiendo mediante el aumento de GMPc en la plaqueta la agregación de estas frente a estímulos como la epinefrina o la trombina.

Como vimos en la introducción de esta tesis doctoral, la trombogénesis no solo se debe al sistema de la coagulación sanguínea y las plaquetas, sino que también existen otros elementos celulares del microentorno vascular que participaban activamente en la misma, entre ellos los neutrófilos. La existencia de una inactivación plaquetaria por acción de los neutrófilos ya se demostró en 1989 por Salvemini et al (235). Según estos autores, este efecto se debía a un mecanismo dependiente de NO y mediado por GMPc. Por el contrario a lo aquí establecido, el grupo de Del Maschio describió un efecto proactivante por parte de los neutrófilos. Según los hallazgos de López-Farré et al, se demostró que estos datos contradictorios se deberían, a la luz de los resultados obtenidos en sus experimentaciones, a la presencia o ausencia de aspirina en el medio de incubación de las plaquetas y a las relevantes diferencias en las condiciones de experimentación, entre ellas el lavado de plaquetas o PRP y la pre-estimulación de neutrófilos con citocalasina B. En este sentido, los resultados de Salvemini et al concordarían con los de López-Farré et al.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el NO sintetizado por las plaquetas desempeña un papel muy importante como regulador de la actividad plaquetaria puesto que es capaz de inhibir la agregación plaquetaria y el reclutamiento de plaquetas al

trombo en crecimiento (165,166). Es comprensible que al leer estas líneas nos hagamos varias preguntas que exigen respuesta, entre ellas: ¿De qué manera se relaciona el NO con la función de la plaqueta? ¿Cómo afecta funcionalmente a la plaqueta y al reclutamiento plaquetario?

En primer lugar, se ha demostrado que existen otros agentes agregantes, como el ADP y el ácido araquidónico, que activan la síntesis de NO, puesto que la agregación plaquetaria inducida por estos agentes es también reducida por la L-arginina. Además, los inhibidores de la formación de NO, todos ellos antagonistas competitivos de la L-arginina, como el L-NMMA, L-NAME y L-NIO (236-238) potencian la agregación inducida por estos agentes plaquetarios. Los inhibidores de la NOS son similarmente efectivos a la hora de potenciar la agregación inducida por ácido araquidónico y ADP pero menos que la trombina. Este perfil de agregación plaquetaria inducida por el NO endógeno se correlaciona bien con el efecto observado por el NO exógeno en la acción agregante de todos estos agentes, en orden de potencia, ácido araquidónico = ADP > trombina > A23187 (239). Estos resultados muestran que los agentes agregantes estimulan una vía común, la cual permite la síntesis de NO a partir de L-arginina. La estimulación plaquetaria con agentes agregantes resulta en un aumento de 100 veces mayor la concentración de Ca^{2+} citosólico (240). Puesto que la síntesis de NO es Ca^{2+} -dependiente, es probable que este fuerte incremento en la concentración de Ca^{2+} active la enzima y dispare la síntesis de NO.

La formación de NO en las plaquetas se acompaña a su vez de la estimulación de la enzima guanilato ciclasa soluble y de un incremento intraplaquetario de los niveles de GMPc (172). Sin embargo, el incremento en los niveles de GMPc produce el secuestro de Ca^{2+} (241), reduciendo los niveles de Ca^{2+} libre para la agregación. La plaqueta contiene NOS3, como bien han demostrado numerosos estudios previos (165,166,242,243) y el NO producido inhibe la agregación de plaquetas mediante el aumento de los niveles de GMPc citoplasmático, contribuyendo de una manera importante a las propiedades antitrombogénicas de endotelio. En este sentido, Camilletti et al desarrollaron un estudio en el cual el objetivo fue investigar en las plaquetas la producción de NO los niveles citosólicos de Ca^{2+} , tanto en pacientes con hipertensión esencial como en sujetos sanos. De esta manera, en el estudio se incluyeron 36 sujetos en los que se investigó la producción de NO (21 pacientes tenían hipertensión esencial y

15 sujetos eran normotensos). La actividad de la NOS se evaluó mediante la medición de los niveles de nitrito por la reacción de Griess en el sobrenadante de las plaquetas sometidas a ultrasonidos. Los niveles de Ca^{2+} citosólico se midieron en las plaquetas intactas utilizando la sonda fluorescente Fura 2-AM. Así, se encontraron mayores niveles de NO en las plaquetas de individuos normotensos en comparación con las plaquetas de pacientes hipertensos ($p < 0,0001$). Del mismo modo, los niveles de NO en mujeres hipertensas fueron significativamente mayores que en los hombres hipertensos ($P < 0,001$). Las mujeres y los hombres hipertensos tenían niveles más bajos de nitrito de que mujeres y hombres normotensos ($p < 0,001$ y $p < 0,002$, respectivamente). Por otro lado, se registraron mayores niveles citosólicos de Ca^{2+} en las plaqueta de pacientes hipertensos que en los normotensos ($p < 0,001$).

En base a otros estudios existentes en la literatura científica, se ha caracterizado que el NO derivado de la plaqueta está involucrado en el proceso de reclutamiento plaquetario. Siguiendo la trayectoria de los distintos estudios, actualmente se sugiere que los efectos del NO derivado de la plaqueta podrían ser más consistentes con regulación paracrina de la regulación plaquetaria, algo que concuerda con la existencia con el hallazgo de mayores niveles de selectina P sobre la superficie de las plaquetas de una población expuesta a niveles reducidos de NO derivado de la plaqueta. En este sentido, Freedman et al (166) desarrollaron un experimento en el que comparaban simultáneamente dos poblaciones diferentes de plaquetas para poder estudiar los efectos del NO derivado de la plaqueta sobre el reclutamiento plaquetario. En consonancia con otros estudios similares (244,245), la medida de la producción de NO en plaquetas activadas se correspondería con el efecto del aminoácido L-arginina y los inhibidores de la enzima NOS. La cantidad de NO producida por una plaqueta activada es superior a 5×10^{-17} moles, aunque la producción de NO bajo la acción de diferentes agonistas podría variar dependiendo de las condiciones de concentración de Ca^{2+} como consecuencia de su movilización, ya que la producción de este gas es Ca^{2+} -dependiente (245). Estudios previos (166) han concluido que la inhibición de la producción de NO derivado de la plaqueta incrementa la agregación plaquetaria y la secreción en una población de plaquetas susceptibles de ser reclutadas.

En nuestros resultados, a pesar de que los niveles de expresión de enzima NOS3 eran mayores en las plaquetas sensibles a aspirina que en las plaquetas resistentes a

aspirina, la capacidad de las plaquetas sensibles a aspirina para producir NO, determinada como el contenido de nitratos + nitritos en los sobrenadantes plaquetarios, no era significativamente distinta con respecto a la de las plaquetas resistentes a aspirina. Esto sugiere que en condiciones de reposo, la capacidad de producir NO por las plaquetas sensibles a aspirina se atenúa.

6.2. ¿A qué se debe la atenuación de la vía del NO en las plaquetas sensibles a aspirina en comparación con las plaquetas resistentes a aspirina?

Como bien indica el título de este apartado, la primera cuestión que hay que comentar sobre los resultados obtenidos en este trabajo de tesis es, ¿por qué la actividad del NO parece estar atenuada en las plaquetas sensibles a aspirina por comparación frente a las resistentes a aspirina? Hay muchos factores involucrados en la regulación de la actividad de la enzima NOS3 y, entre ellos, se ha demostrado que el ADMA, del que ya hemos hablado previamente en la introducción de esta tesis doctoral, es un inhibidor endógeno de la actividad de esta enzima (168). En este sentido, la disfunción de la vía endotelial L-arginina-NO es un mecanismo común por el cual muchos factores de riesgo cardiovascular median sus efectos deletéreos en la pared vascular. Vallance et al (215) describieron primeramente el ADMA como un inhibidor endógeno de la enzima NOS en el endotelio favoreciendo la disfunción de este órgano. Y, como ya se ha descrito en el apartado de introducción de esta tesis doctoral, desde su descubrimiento en 1992, el papel de esta molécula en la regulación de la síntesis del NO endotelial ha ido despertando una atrayente atención. En el presente trabajo de tesis doctoral se observaron en plasma niveles similares de ADMA entre pacientes con plaquetas sensibles y resistentes a aspirina, lo que disminuye la posibilidad de que la diferente producción de NO entre plaquetas sensibles y resistentes a la aspirina se deba a la presencia de diferentes concentraciones de ADMA en el PRP.

6.2.1. La paradoja de la L-arginina

Ya hemos mencionado previamente en la introducción de esta tesis doctoral la acción que desempeña la L-arginina y los curiosos efectos contradictorios que muestra cuando se administra a mayores dosis durante un tiempo prolongado. Por tanto, la paradoja de la L-arginina se resume en lo siguiente: La suplementación con un exceso de L-arginina, más frecuentemente en el agua de bebida, reduce el empeoramiento en la vasodilatación dependiente del endotelio en ratones con hipercolesterolemia y

aterosclerosis (246-249). Además, la suplementación con L-arginina también incrementa la inhibición de la agregación plaquetaria dependiente del endotelio (250), inhibe la adhesión de los monocitos (251) y reduce la proliferación del músculo liso vascular (252). Por ende, estos hallazgos en estudios in vivo contrastan de una forma bastante marcada con otros experimentos en los que la adición de L-arginina a anillos arteriales aislados in vitro no afecta a la vasodilatación dependiente del endotelio (253). Según estudios previos, la evidencia experimentos in vitro con la enzima NOS3 clonada y purificada en un sistema libre de células con las concentraciones óptimas de todos los cofactores sugiere que la constante de Michaelis-Menten (K_m) para esta encima es de aproximadamente 3 $\mu\text{moles/L}$ (254). Por el contrario, la concentración de L-arginina circulante en plasma tanto en individuos sanos como con enfermedad cardiovascular tiene un rango desde 40 a 10 $\mu\text{mol/L}$ (255). En otras palabras, es del orden de 15 a 30 veces mayor que la K_m de la NOS3. Incluso en un estudio según el cual la concentración de L-arginina en plasma se veía reducida bajo condiciones de hipercolesterolemia, la concentración de L-arginina media era de 78 $\mu\text{mol/L}$, comparada con los 111 $\mu\text{mol/L}$ en individuos control normocolesterolémicos (256). En este sentido, estos datos sugieren que bajo concentraciones fisiológicas de L-arginina, la enzima NOS3 debería estar saturada de sustrato, y la adición de L-arginina exógena no debería afectar la actividad de la enzima. Por estas razones, esta evidente discrepancia ha recibido el curioso nombre de "paradoja de la L-arginina" y, con el fin de explicar esto, el grupo de Böger et al planteó la hipótesis de que la presencia en plasma de un inhibidor competitivo de la NOS3 podría ser el responsable de esta paradoja (257), como ya hemos mencionado anteriormente.

A pesar de todo el conocimiento existente acerca del ADMA, en nuestro estudio, niveles similares de ADMA fueron observados entre pacientes con plaquetas sensibles a aspirina y plaquetas resistentes a aspirina. Ello disminuye la posibilidad de que la producción de NO en plaquetas sensibles y resistentes a aspirina pueda estar relacionada con la presencia de niveles diferentes de ADMA.

6.2.2. Acción reguladora del mecanismo de fosforilación de NOS3

La fosforilación de NOS3 es otro factor importante de regulación de la actividad de la enzima. En el presente estudio, en las plaquetas sensibles a aspirina se encontraron cantidades mayores de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 que en las que eran

resistentes a la acción del fármaco. Además se observó una clara asociación positiva entre la respuesta plaquetaria a aspirina y el contenido de NOS3 fosforilada en Ser 1177 en las plaquetas.

Es un hecho bien conocido que cuando la proteína NOS3 se fosforila en el residuo Ser 1177, el flujo de electrones a través del dominio reductasa se ve reducido y, consecuentemente, también se reduce la producción de NO (258). En efecto, la activación de NOS3 en las plaquetas se ha relacionado con la fosforilación de NOS3 en el mencionado residuo Ser 1177. Sin embargo, en nuestros experimentos, las plaquetas sensibles a aspirina, mostraron un mayor contenido de NOS3 fosforilada en la Ser 1177 que las plaquetas resistentes, pero su aparente capacidad de producir NO no era significativamente diferente entre ellas.

Teniendo en cuenta que la importancia de la fosforilación en la regulación de la actividad NOS3 está bien aceptada, hay que señalar la que se produce en el residuo Ser 1177 de la enzima, siendo una de las mejor establecidas actualmente (259). En la plaqueta de hecho, es el centro de fosforilación Ser 1177 de NOS3 el único establecido e identificado unido a la mayor actividad de la enzima. A diferencia de esto, en las células endoteliales, en la NOS3 se han descrito otros sitios de fosforilación e incluso algunos de ellos asociados con la reducción de la actividad de la NOS3 (260). Por lo tanto, podría ocurrir también que en las plaquetas sensibles a aspirina otros sitios de fosforilación en la proteína NOS3 puedan contrarrestar la fosforilación en el residuo Ser 1177 y, en última instancia, atenuar la actividad NOS3. Además, dado que una compleja variedad de proteínas y cofactores que interactúan con NOS3 están involucrados en la regulación de la actividad de la enzima NOS3, con los presentes experimentos no se puede descartar que alguno de ellos estuviesen involucrados en la atenuación de la actividad de la NOS3 plaquetaria en las plaquetas sensibles a aspirina. Por tanto, se necesitan más trabajos experimentales específicos para obtener una clara respuesta a todos los interrogantes.

6.3. Alteraciones genéticas en el gen NOS3: Mutación T-786→C en la región promotora del gen

Se ha demostrado que la mutación T⁻⁷⁸⁶→C en el promotor del gen NOS3 reducía la expresión de NOS3 (170). En relación a esto último, existe un estudio previo

desarrollado por Nakayama et al en el que se llevó a cabo la detección e identificación de posibles mutaciones y la secuenciación de la región 5' flanqueante del promotor del gen NOS3, realizándose para ello un análisis por PCR-SSCP en extractos de ADN obtenidos de 11 pacientes típicos con espasmo coronario así como 11 sujetos control. En 4 de los 11 pacientes con espasmo coronario, se descubrió la presencia de bandas variantes en los productos de PCR de los fragmentos F7, F9 y F14, pero no se encontraron bandas variantes en los 9 sujetos control.

El mismo grupo secuenció posteriormente los fragmentos sustituidos y no sustituidos, identificando así 3 mutaciones puntuales: Una mutación T a C en la posición nucleotídica -786, una mutación A a G en posición -922, y una mutación T a A en posición -1468. Estos resultados fueron posteriormente confirmados mediante la secuenciación completa del gen NOS3 desde la posición -1533 a +44. La secuencia del gen de sujetos con bandas variantes fue virtualmente idéntico al de los sujetos control excepto por las tres sustituciones descritas.

A través del examen realizado en la relación entre estas mutaciones y el espasmo coronario, el grupo de Nakayama et al, buscó dichas mutaciones en 174 pacientes con espasmo coronario y en 161 sujetos control, comprobándose que estas mutaciones siempre aparecían vinculadas entre sí y con mayor frecuencia en los pacientes con espasmo coronario que en los sujetos control. El mismo grupo describió, por una parte, un efecto supresor de la transcripción del gen NOS3, exclusivamente a través de la mutación $T^{-786} \rightarrow C$ y, por otra parte, que bajo condiciones de hipoxia se incrementaba la actividad del promotor del gen NOS3. Esta reducción en la transcripción del gen NOS3 se corresponde con la menor producción de NO en pacientes portadores de la mutación $T^{-786} \rightarrow C$. En este sentido, gracias a estos estudios previos se ha podido sugerir con sumo acierto que la presencia de alelos mutantes del gen NOS3 reduce la producción endotelial de NO en las arterias coronarias, hecho que predispone a los pacientes para padecer espasmo coronario.

En el estudio de esta tesis doctoral, más de la mitad de los pacientes con isquemia coronaria estable mostraban homocigosis para CC en -786 en la región flanqueante 5' del gen NOS3, lo que concuerda con los resultados obtenidos en trabajos previos que demostraban que la mutación $T^{-786} \rightarrow C$ en el promotor de NOS3 estaba asociado con isquemia coronaria estable y espasmo coronario (168). Sin embargo, la

distribución de alelos en el sitio -786 en el promotor de NOS3 no revelaba diferencias entre pacientes con plaquetas sensibles y resistentes a aspirina, descartándose esta alteración genética como contribuyente de la diferente expresión de NOS3 entre ellos.

Además de estos factores genéticos, existen otros factores que pueden regular la expresión del gen NOS3. Entre ellos, existen factores inflamatorios que han demostrado su rol en la alteración de la expresión del gen NOS3 (261). Uno de estos factores podría ser la proteína C reactiva, un reactante de fase aguda que se considera un importante marcador de inflamación sistémica, ya que se ha encontrado elevado en pacientes con isquemia aguda, infarto de miocardio y angina inestable. La interrelación entre la proteína C reactiva y aspirina merece una consideración especial. Según Ridker et al, el efecto de aspirina en la prevención de un infarto de miocardio era mayor entre los hombres con unas concentraciones basales superiores y su beneficio se veía considerablemente reducido con concentraciones decrecientes de este marcador inflamatorio. Así, aunque los efectos antiplaquetarios de aspirina puedan ser modificados por la inflamación, se sugiere la posibilidad de que el beneficio de aspirina pueda deberse a sus efectos antiinflamatorios. Sin embargo, pese a estas observaciones, no está del todo claro que la resistencia a aspirina pueda estar asociada con la inflamación sistémica. En este sentido, aunque algunos trabajos han postulado una posible relación entre la inflamación y la respuesta plaquetaria a aspirina, entre los que se encuentra un estudio proteómico en plasma realizado por nuestro propio grupo (262). En este punto, es interesante recordar que los mecanismos relacionados con el NO pueden constituir un mecanismo de retroalimentación negativo regulador de la expresión del gen NOS3. Además, a título especulativo, la capacidad atenuada para producir NO por las plaquetas sensibles a aspirina puede producir por sí sola la expresión de NOS3 en las mismas.

Con el presente diseño experimental no es posible descartar que la modulación de la expresión de la proteína NOS3 en las plaquetas pueda estar ocurriendo en las plaquetas maduras puesto que éstas contienen un número determinado de ARNs mensajeros. Sin embargo, también es posible que la distinta expresión de NOS3 pueda ser la consecuencia de la formación de diferentes tipos de plaquetas producidas a partir de los megacariocitos. De acuerdo con esto, nuestro grupo ha descrito que otras proteínas plaquetarias constitutivas, como aquellas relacionadas con el metabolismo energético, el estrés oxidativo y los procesos de supervivencia celular, muestran

también un diferente nivel de expresión en las plaquetas sensibles a aspirina con respecto a las plaquetas resistentes. De esta manera, se precisan más estudios que permitan analizar los mecanismos que promueven la mayor expresión de la proteína NOS3 en las plaquetas sensibles a aspirina.

6.5. Diferente respuesta a aspirina de plaquetas resistentes y sensibles tras estimulación con colágeno

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los hallazgos presentados en esta tesis doctoral pueden antojarse algo complejos a la hora de explicar por qué la capacidad de producir NO por las plaquetas sensibles a aspirina no es significativamente diferente a la de las plaquetas resistentes, pese a que el mayor contenido en NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 se asocia positivamente con la respuesta funcional a aspirina por parte de la plaqueta. La pregunta que nos surgió entonces es si estas diferencias tendrían realmente su importancia cuando la plaqueta fuese activada.

El colágeno es un conocido estimulador de la activación plaquetaria que, a su vez, es susceptible de ser inhibido por aspirina. El colágeno también promueve la síntesis de NO, seguramente para limitar la activación plaquetaria. Durante la estimulación con colágeno de las plaquetas sensibles a aspirina, la fosforilación en el residuo Ser 1177 de la enzima NOS3 se incrementó con respecto a aquellas plaquetas que se encontraban en reposo. Sin embargo, durante la estimulación con colágeno de plaquetas resistentes a aspirina, sólo se produjo un ligero incremento de los niveles de fosforilación de NOS3 en el residuo Ser 1177. Además, en respuesta a colágeno, las plaquetas resistentes a aspirina no producían tanta cantidad de nitratos+nitritos como las sensibles a aspirina. Por otro lado, las plaquetas sensibles a aspirina presentaban abolida su respuesta agregante a concentraciones submáximas de colágeno, mientras que las plaquetas resistentes a aspirina eran más sensibles a la activación por colágeno. De acuerdo con esto, trabajos previos han demostrado una respuesta más sensible a colágeno por las plaquetas resistentes que las sensibles a aspirina (125).

En condiciones de reposo, el menor contenido de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 y el menor incremento observado después de la estimulación por colágeno en las plaquetas resistentes a aspirina podría estar en concordancia con la mayor susceptibilidad de las plaquetas de ser activadas. Además, estos hallazgos pueden

revelar la alteración de la producción de NO como un nuevo mecanismo que permita explicar la mayor susceptibilidad de las plaquetas resistentes a aspirina a ser activadas, lo que podría contribuir al riesgo aumentado de desarrollar episodios cardiovasculares relacionados con procesos trombóticos, hecho que ya ha sido asociado con la resistencia plaquetaria a aspirina (163).

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Evidentemente, es necesario hacer hincapié en una serie de consideraciones y limitaciones de los experimentos que han dado lugar a esta tesis. Al igual que en diferentes trabajos previos, la principal limitación del presente estudio podría ser la metodología empleada para clasificar los grupos sensibles y resistentes a aspirina. Sin embargo, el análisis PFA-100 ha sido extensamente empleado para determinar la respuesta plaquetaria a aspirina. En este sentido, diferentes meta-análisis han demostrado la asociación existente entre las plaquetas resistentes a aspirina con un mayor riesgo de sufrir episodios cardiovasculares empleando un dispositivo de análisis PFA-100. Sin embargo, los resultados aquí observados deberían estar asociados solamente con la clasificación de resistencia y sensibilidad a la aspirina en relación con el test de PFA-100 como significado de clasificación de la respuesta plaquetaria a aspirina. Un paciente podría mostrar resistencia a aspirina debido a un reducido cumplimiento de la terapia con aspirina. De hecho, se sabe que hasta un 40 % de los pacientes con enfermedad cardiovascular no cumplen el tratamiento con aspirina (118). En este sentido, administramos una dosis adicional de aspirina para confirmar el resultado del ensayo PFA-100 y sólo se incluyeron en el estudio aquellos pacientes que mostraban un rango TC similar en respuesta a epinefrina en el momento de la inclusión y una hora después de la administración adicional de 100 mg de aspirina.

Además, el tratamiento con IECAs podría ser considerado como un factor de confusión porque más pacientes con plaquetas sensibles a aspirina se encontraban bajo este tratamiento. Sin embargo, el efecto de los IECAs en los resultados aquí recogidos podría descartarse ya que el tratamiento con IECA se usó como covariable en el modelo de regresión lineal.

Otro punto importante es la pureza de las plaquetas en el PRP. En este sentido, el contenido de plaquetas en el PRP podría estar contaminado con otras células presentes

en la sangre, sobre todo leucocitos y eritrocitos. De esta manera, según su trabajo, Gambaryan et al informaron sobre una falta de expresión de enzima NOS3 en las plaquetas humanas, sugiriendo que en otros estudios que demostraban la presencia de NOS3 en las plaquetas humanas, los hallazgos se debían a una potencial contaminación por eritrocitos y leucocitos (163). Sin embargo, otros autores también han sugerido que la contaminación de las preparaciones de plaquetas por otras células es irrelevante para contabilizar la actividad NOS plaquetaria puesto que en la mayor parte de los casos el NO era sintetizado por las muestras plaquetarias en respuesta a agonistas fisiológicos de la plaqueta, agonistas a los cuales ni los eritrocitos ni los leucocitos respondían. Además, diferentes grupos han demostrado que los eritrocitos humanos aunque contienen NOS3 carecen de actividad catalítica para producir NO. No obstante, los resultados obtenidos en los experimentos de citometría de flujo demostraron que la presencia de eritrocitos y leucocitos es muy baja y similar a aquella que nuestro mismo equipo había descrito previamente en otros artículos (263) al igual que otros autores (264) y que en ningún caso pueden justificar que los resultados aquí obtenidos sobre el NO y su relación con la respuesta plaquetaria a aspirina pudieran deberse a la presencia de estas otras células.

Otro de los puntos principales que necesita aclaración en este estudio es probablemente que, bajo condiciones de reposo, las plaquetas sensibles y resistentes a aspirina liberaban cantidades similares de nitratos+nitritos mientras que la fosforilación de la enzima NOS3 en el residuo Ser 1177 fue significativamente mayor en las plaquetas sensibles a aspirina. Como se ha mencionado anteriormente, la actividad NOS3 está regulada por muchos cofactores y no sólo mediante fosforilación. Entre estos factores que regulan la fosforilación de la NOS3 se encuentra la localización celular de NOS3 en invaginaciones del plasmalema plaquetario, llamadas caveolas, donde NOS3 interacciona con caveolinas atenuando la activación de la misma (263). A su vez, a título especulativo y basándonos principalmente en los resultados observados durante la estimulación por colágeno, es posible que en las plaquetas resistentes a aspirina el ciclo de activación de la enzima NOS3 pueda estar interrumpido en más de un paso, algo que sería más evidente durante la activación plaquetaria, siendo el ligero incremento en la fosforilación de NOS3 en Ser 1177 en las plaquetas resistentes después de la estimulación con colágeno un reflejo de ello.

CONSIDERACIONES FINALES

Si bien existen diversos meta-análisis que han demostrado que los pacientes resistentes a aspirina presentan mayor riesgo de padecer eventos cardiovasculares importantes clínicamente adversos, no se conocen realmente muchos mecanismos moleculares implicados en el síndrome de resistencia a aspirina. Se han desarrollado numerosos estudios según los cuales se relacionaba la diferente respuesta funcional de la plaqueta a aspirina con la actividad de la enzima NOS.

En nuestro equipo de trabajo se han seguido estudiando los posibles mecanismos moleculares relacionados con la resistencia a aspirina, habiéndose realizado importantes hallazgos, entre ellos unos mayores niveles de tres isoformas de DBP en las plaquetas de pacientes resistentes a aspirina que reduce la capacidad de la aspirina de inhibir la síntesis de TxA₂. También describimos como en el contenido de algunas proteínas asociadas al metabolismo energético y al estrés oxidativo, las plaquetas sensibles y resistentes son diferentes. Continuando esa línea de investigación, el presente estudio pone de manifiesto nuevos datos sobre los mecanismos moleculares que puedan estar potencialmente asociados al síndrome de resistencia a aspirina

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se ha correlacionado la resistencia plaquetaria a aspirina con el contenido plaquetario de NOS3 fosforilada en Ser 1177, teniendo en cuenta que este mecanismo de fosforilación es uno de los principales en la regulación postranscripcional de la enzima NOS3 para la síntesis de NO. Una pregunta que nos podemos hacer pero a la que aún no le podemos dar respuesta es en qué momento del desarrollo de la plaqueta se comienzan a producir las diferencias moleculares aquí descubiertas entre plaquetas resistentes y sensibles a aspirina. ¿Existe además algún condicionante genético diferente de la mutación que nosotros hemos estudiado que pueda estar implicado de forma genética en esa diferente respuesta funcional a aspirina por la plaqueta de determinados individuos? ¿Se debería quizás a modificaciones en el desarrollo del megacariocito antes de la formación de la plaqueta? ¿Podría llegar a emplearse ese mayor contenido en NOS3 fosforilada en Ser 1177 como un buen biomarcador de resistencia plaquetaria a aspirina o incluso como potencial diana terapéutica?

Como final de esta tesis, en el gráfico siguiente se resumen las aportaciones nuevas al conocimiento de los mecanismos asociados a la resistencia plaquetaria a aspirina producidas por el trabajo de esta tesis doctoral (Figura 24).

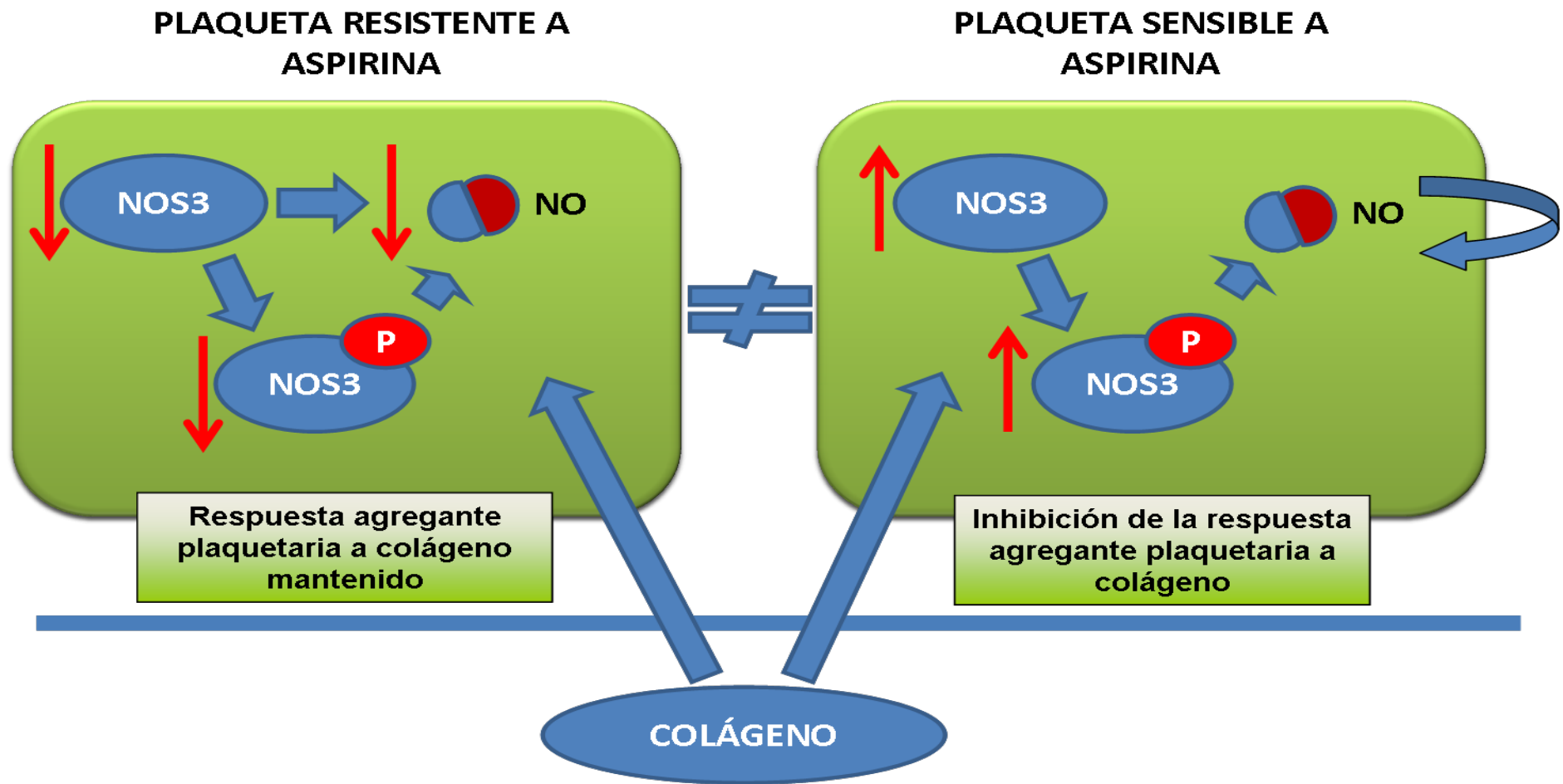


Figura 24. Resumen de los principales hallazgos de esta tesis doctoral. En presencia de colágeno, las plaquetas sensibles a aspirina aumentan el contenido de NOS3 fosforilada en Serina 1177, lo que se asocia a un aumento en la producción de NO y a la inhibición de la capacidad agregante plaquetaria por colágeno. Sin embargo, en las plaquetas resistentes a aspirina, el colágeno no modifica ni los niveles de NOS3 fosforilada en Serina 1177 ni la producción de NO manteniéndose una respuesta agregante plaquetaria al colágeno.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO

Las conclusiones de este trabajo de tesis doctoral son:

1. Las plaquetas sensibles a aspirina presentan unos niveles mayores de expresión de la enzima NOS3 en comparación con las plaquetas resistentes a aspirina, lo que condiciona la diferente capacidad de generación de NO.
2. La respuesta funcional de la plaqueta a aspirina condiciona la formación de enzima NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177 en la plaqueta, ya que las plaquetas sensibles a aspirina contienen niveles mayores de esta forma fosforilada de la enzima que las resistentes. En este sentido, existe una clara asociación entre la respuesta plaquetaria a aspirina y el contenido plaquetario de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177.
3. La diferente expresión de la enzima NOS3 entre plaquetas sensibles y resistentes a aspirina no es debida a una alteración genética en el promotor del gen que codifica la enzima.
4. Durante la estimulación de plaquetas con un agente proagregante plaquetario como el colágeno es cuando se hace más evidente la diferencia en la capacidad de generación de NO entre plaquetas sensibles y resistentes a aspirina.
5. En las plaquetas resistentes a aspirina, la estimulación con colágeno no modifica la liberación de nitratos + nitritos (como medida de NO), ni el contenido plaquetario de NOS3 fosforilada en el residuo Ser 1177.
6. Como consecuencia de la estimulación con colágeno las plaquetas sensibles a aspirina aumentan el contenido de NOS3 fosforilada en Ser 1177, mientras que el contenido de esta forma fosforilada activa de NOS3 no se vio modificada en las plaquetas resistentes a aspirina tras la estimulación con colágeno.
7. Existe una asociación positiva entre la capacidad de inhibición de la aspirina sobre la agregación plaquetaria, el contenido plaquetario de NOS3 fosforilada en Ser 1177 y la capacidad de formación de NO por la plaqueta.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Robb-Smith A. Why the platelets were discovered. *Br J Haematol* 1967; 13:618-637.
2. Wintrobe M. Hematology, the Blossoming of a Science: A Story of Inspiration and Effort. *Philadelphia: Lea & Febiger* 1985:28-31.
3. Spaet T. Platelets: the blood dust. En Wintrobe M, ed. *Blood, Pure and Eloquent. New York: Mc Graw Hill* 1980:549-571.
4. Quick A. The historical development of the concepts of Hemostasis. En: Quick A, ed. *Hemorrhagic Diseases and Thrombosis. Philadelphia. Lea & Fabiger* 1966:15-33.
5. Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv Pathol Anat* 1885; 90:261-332.
6. George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355:1531–1539.
7. Dreyfus C. Georges Hayem (1841-1935). *J Lab Clin Med* 1942; 27:855-865.
8. Gregg D, Goldschmidt-Clermont PJ. Platelets and Cardiovascular Disease. *Circulation* 2003; 108: e88-e90.
9. Tan S, Tan HT, Chung MC. Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* 2008; 8: 3924-3932.
10. Almén MS, Nordström KJ, Fredriksson R, Schiöth HB. Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol* 2009; 7: 50.
11. Speers AE, Wu CC. Proteomics of integral membrane proteins-theory and application. *Chem Rev* 2007; 107: 3687-3714.
12. Asazuma N, Wilde JI, Berlanga O, Leduc M, Leo A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Bon C, Liu SK, McGlade CJ, Schraven B, Watson SP. Interaction of linker for activation of T cells with multiple adapter proteins in platelets activated by the glycoprotein VI-selective ligand, convulxin. *J Biol Chem* 2000; 275(43):33427-33434.
13. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(9):1381-1389.

14. Pepper DS: Macromolecules released from platelet storage organelles. *Thromb Haemost* 1980; 42:1667.
15. Ross R: Atherosclerosis: A problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Artherosclerosis* 1981; 1:301.
16. Mackie JJ: The biology of haemostasis and thrombosis. En Weatherall DJ, Ledingham JGG y Warrell DA, Eds.: Oxford Textbook of Medicine. Oxford. Oxford University Press. 3ª Ed. 1996; 3613.
17. Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. En: Bloom AL, Forbes Cd, Thomas DP, Tuddenham EGD, Eds. Haemostasis and Thrombosis, 3rd ed, Vol1. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994; 259-285.
18. Marcus AJ. Platelets and their disorders. In: Ratnoff OD, Forbes CD, eds Disorders of Haemostasis, 3rd ed Philadelphia: Saunders; 1994.
19. Ware JA, Heistad DD. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Platelet-endothelium interactions. *N Engl J Med* 1993; 328(9):628-635.
20. Jia XQ, Dong CM, Qin J, Zhang L. Changes in coagulation and fibrinolysis in the patients with coronary heart disease in acute period and effect of drug intervention. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2012; 24(4):225-8.
21. Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle beider Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv Pathol Anat* 1985;90:261-332.
22. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Berndt MC. Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life* 2004; 56:13-18.
23. Petri B, Boermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F. Von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood* 2010; 116:4712-4719.
24. Dasgupta S, Repesse Y, Bayry J, Navarrete AM, Wootla B, Delignat S, Irinopoulou T, Kamaté C, Saint-Remy JM, Jacquemin M, Lenting PJ, Borel-Derlon A, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. vWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood* 2007; 109:610-612.
25. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outsidein and sideways. *Thromb Haemost* 1999; 82:318-325.

26. Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 16):3415-3425.
27. Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law CL, Watson SP. Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1996; 271(30):18095-18099.
28. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett* 1997; 413(2):255-259.
29. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J* 1997; 16(9):2333-2341.
30. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem* 1997; 272(38):23528-23531.
31. Nieswandt B, Watson SP Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102(2):449-461.
32. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(3):403-412.
33. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8):1752-1762.
34. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res* 2008; 122(6):786-803.
35. Lockyer S, Okuyama K, Begum S, Le S, Sun B, Watanabe T, Matsumoto Y, Yoshitake M, Kambayashi J, Tandon NN. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb Res* 2006; 118(3):371-380.
36. Kato K, Kanaji T, Russel S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* 2003; 102(5):1701-1707
37. Briddon SJ, Watson SP. Evidence for the involvement of p59fyn and p53/56lyn in collagen receptor signalling in human platelets. *Biochem J* 1999; 338(Pt 1):203-209.

38. Walker TR, Watson SP. Synergy between Ca²⁺ and protein kinase C is the major factor in determining the level of secretion from human platelets. *Biochem J* 1993; 289:277-282.
39. Heemskerk JW, Siljander PR, Bevers EM, Farndale RW, Lindhout T. Receptors and signaling mechanisms in the procoagulant response of platelets. *Platelets* 2000; 429-445.
40. Leo A, Schraven B. Networks in signal transduction: the role of adaptor proteins in platelet activation. *Platelets* 2000; 11(8):429-445.
41. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7):1602-1612.
42. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 2004; 114(4):221-233.
43. Calderwood Da. Integrin activation. *J Cell Sci* 2004; 117:657-666.
44. Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* 2002; 158:833-839.
45. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: The platelet paradigm. *Blood* 1998; 91:2645-2657.
46. Woulfe D, Jiang H, Morgans A, Monks R, Birnbaum M, Brass LF. Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. *J Clin Invest* 2004; 113(3):441-450.
47. Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc Res* 2009; 82(2):261-271.
48. Armstrong RA. Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther* 1996; 72(3):171-191.
49. Halushka PV, Mais DE, Morinelli TA. Thromboxane and prostacyclin receptors. *Prog Clin Biol Res* 1989; 301:21-28.
50. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Detective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 1997; 389(6647):183-186.
51. Calvete JJ. Structures of integrin domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of alphaIIb beta3. *Exp Biol Med* (Maywood) 2004; 229:732-744.
52. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: Dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004; 104:1606-1615.

53. Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of FcγRIIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets.
54. Belhassen L, Pelle G, Dubois-Rande JL, Adnot S. Improved endothelial function by the thromboxane A₂ receptor antagonist s18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:1198-1204.
55. Chen C, Chai H, Wang X, Jiang J, Jamaluddin MS, Liao D, et al. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* 2008; 112:3205-3216.
56. Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, et al. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem* 1996; 271:27723-27729.
57. Marcus AJ. Multicellular eicosanoid and other metabolic interactions of platelets and other cells. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, Eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and Clinical Practice, 3rd ed. Philadelphia: Lipincott 1994; 590-602.
58. Ambler J, Birch J, Maguire ED, Wallis RB. Role of thromboxane A₂. *Adv Exp Med Biol* 1985; 192: 293-308.
59. Shen RF, Tai HH. Thromboxane synthase and receptors. *J Biomed Sci* 1998; 5(3):153-172.
60. Murugappan S, Shankar H, Kunapuli SP. Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A₂. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30(4):411-418.
61. Léon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptornull mice. *J Clin Invest* 1999; 104:1731-1737.
62. Tomiyama Y, Tsubakio T, Piotrowicz RS, Kurata Y, Loftus JC, Kunicki TJ. The Arg-Gly-Asp (RGD) recognition site of platelet glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets is accessible to high-affinity macromolecules. *Blood* 1992; 79:2303-2312.

63. Mackie JJ: The biology of haemostasis and thrombosis. En Weatherall DJ, Ledingham JGG y Warrell DA, Eds.: Oxford Textbook of Medicine. Oxford. Oxford University Press. 3ª Ed. 1996; 3613.
64. Arachiche A, Mumaw MM, de la Fuente M, Nieman MT. Protease activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1 enhanced cleavage of PAR4 by α -thrombin. *J Biol Chem* 2013.
65. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 1999; 103(6):879-887.
66. Marcus AJ. Cellular interactions of platelets in thrombosis. In: Loscalzo J, Schafer AI, eds. Thrombosis and Hemorrhage. Boston: Black-Well Scientific; 1994; 279-289.
67. Tonnes MG, Smelly LA y Henson PM: Neutrophil-endothelial cell interactions. *J Clin Invest* 1984; 74: 1581-1592.
68. Lo SK, Deters PA, Levin SM y Wright SD: Transient adhesion of Eukaryotes to endothelium. *J Exp Med* 1989; 169: 1779-1793.
69. Lustier T, Dietrich D, Buhler y Vanhoutte P. Interactions between platelets and the vessel wall. Role of endothelium-derived vasoactive substances. En Laragh JH y Brenner, eds.: Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Nueva York. Raven Press Ltd. 1990; 637-648.
70. Sabán Ruiz J. Control global del riesgo cardiometabólico: La disfunción endotelial como diana preferencial. Ediciones Díaz de Santos, 2012; 29-30.
71. Nicolaou KC, Montagnon T. Molecules That Changed the World. Publicado por Wiley-CH, 2008, pág. 13-14. ISBN 3-527-30983-7.
72. Más de 100 años: La historia de aspirina. Bayer Health Care.
73. Aspirina Diccionario de la lengua española de la Real Academia Española, edición 22.
74. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature - New Biology* 1971; 231(25):232-235.
75. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 2003; 110 (5-6):255-258.
76. Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996; 270:G393-400.

77. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995; 270:10902-10908.
78. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2692-2696.
79. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 1975; 56:624-632.
80. Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* 1995; 2:637-643.
81. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. *N Engl J Med* 1989; 321(3):129-135.
82. López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M, Casado S. Effect of aspirin on platelet-neutrophil interactions: role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995; 91:2080-2088.
83. Grosser N, Schroder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the nitric oxide-cGMP pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1345-1351.
84. Santos MT, Vallés J, Aznar J, Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB. Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. Reduction by aspirin. *Circulation* 1997; 95:63-68.
85. Pinckard RN, Hawkins D, Farr RS. In vitro acetylation of plasma proteins, enzymes and DNA by aspirin. *Nature* 1968; 219:68-69.
86. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135-1143.
87. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336:973-979.
88. Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC. Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 1995; 91:1914-1917.

89. Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Pratico D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002; 106:1282-1287.
90. Mateos-Cáceres PJ, Garcia-Mendez A, Farré J, Sanchez de Miguel L, Gomez J, de Andres R, Rico L, Romero J, Lopez-Farre A. Prior aspirin use in unstable angina patients with modified plasma inflammatory markers and endothelial nitric oxide synthase in neutrophils. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:895-900.
91. Osnes LT, Foss KB, Joo GB, Okkenhaug C, Westvik AB, Ovstebo R, Kierulf P. Acetylsalicylic acid and sodium salicylate inhibit LPS-induced NF-kappa B/c-Rel nuclear translocation, and synthesis of tissue factor (TF) and tumor necrosis factor alfa (TNF-alpha) in human monocytes. *Thromb Haemost* 1996; 76:970-976.
92. Molero L, Farré J, García-Méndez A, Jiménez Mateos-Cáceres P, Carrasco Martín C, Millas I, Navarro F, Córdoba M, Casado S, López-Farré A. Endothelin-1 induced proinflammatory markers in the myocardium and leukocytes of guinea-pigs: role of glycoprotein IIB/IIIA receptors. *Cardiovasc Res* 2003; 57:109-18.
93. López-Farré A, Mateos-Cáceres PJ, Esbrit P, Ortega A, Bosch R, Macaya C. Platelets, thrombosis and inflammation: recent data from pharmacological studies. *Inflammation and Chronic Disease*. Ed Transworld Research Net Work. 2006; 103-116.
94. Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein Iib/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 2003; 107:1123-1128.
95. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988; 2:349-360.
96. Nyman I, Larsson H, Wallentin L, and the Research Group on Instability in Coronary Artery Disease in Southeast Sweden. Prevention of serious cardiac events by low-dose aspirin in patients with silent myocardial ischaemia. *Lancet* 1992; 340:497-501.

97. The RISC Group. Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease. *Lancet* 1990; 336:827-830.
98. Lewis HD Jr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE 3rd, Schnaper HW, LeWinter MM, Linares E, Pouget JM, Sabharwal SC, Chesler E, DeMots H. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 1983; 309:396-403.
99. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308:81-106.
100. The Aspirin Myocardial Infarction Study research group. The aspirin myocardial infarction study: final results. *Circulation* 1980; 62:V79-84.
101. The Coronary Drug Project Research Group. Aspirin in coronary heart disease. *J Chronic Dis* 1976; 29:625-642.
102. Elwood PC, Sweetnam PM. Aspirin and secondary mortality after myocardial infarction. *Lancet* 1979; 2:1313-1315.
103. Kent KM, Rosing DR, Ewels CJ, Lipson L, Bonow R, Epstein SE. Prognosis of asymptomatic or mildly symptomatic patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1982; 49(8):1823-1831.
104. Ridker PM, Manson JE, Gaziano JM, Buring JE, Hennekens CH. Low-dose aspirin therapy for chronic stable angina. A randomized, placebo-controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 1991; 114(10):835-839.
105. Hansson L, Zanchetti A, Carruthers G, Dahlöf B, Elmfeldt D, et al. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the hypertension optimal treatment (HOT) randomised trial. *Lancet* 1998; 351:1755-1762.
106. Collaborative Group of the Primary Prevention Project (PPP). Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. *Lancet* 2001; 357:89-95.

107. Ridker PM, Cook NR, Lee I-M, Gordon D, Gaziano JM, et al. A randomised trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2005; 352:1293-1304.
108. Chen WH, Lee PY, Ng W, Tse HF, Lau CP. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(6):1122-1126.
109. Grottemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res* 1993; 71(5):397-403.
110. Bhatt D, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nature Rev* 2003; 2:15–28.
111. Malinin A, Spergling M, Muhlestein B, Steinhubl S, Serebruany V. Assessing aspirin responsiveness in subjects with multiple risk factors for vascular disease with a rapid platelet function analyzer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15:295-301.
112. Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuelian D, et al. Incidence of aspirin nonresponsiveness using the Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA. *Am J Cardiol* 2003; 92:1492-1494.
113. Marshall PW, Williams AJ, Dixon RM, Growcott JW, Warburton S, Armstrong J, Moores J. A comparison of the effects of aspirin on bleeding time measured using the Simplate method and closure time measured using the PFA-100, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 44:151-155.
114. Ziegler S, Maca T, Alt E, Speiser W, Schneider B, Minar E. Monitoring of antiplatelet therapy with the PFA-100 in peripheral angioplasty patients. *Platelets* 2002; 13:493-497.
115. Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, et al. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost* 1997; 78:1003–1007.
116. Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, Reeves MJ, Barber K, De-Franco A. Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2005; 95:973-975.

117. Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, et al. Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J* 2004; 147:293-300.
118. Schwartz KA, Schwartz DE, Barber K, Reeves M, De Franco AC. Non-compliance is the predominant cause of aspirin resistance in chronic coronary arterial disease patients. *J Transl Med* 2008; 6:46.
119. Assadian A, Lax J, Meixner-Loicht U, Hagnmüller GW, Bayer PM, Hübl W. Aspirin resistance among long-term aspirin users after carotid endarterectomy and controls: flow cytometric measurement of aspirin-induced platelet inhibition. *J Vasc Surg* 2007;45:1142-1147.
120. Maclouf J, Folco G, Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost* 1998; 79:691-705.
121. Gerschutz GP, Bhatt DL, The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events study. The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events (CURE) study: to what extent should the results be generalizable? *Am Heart J* 2003; 145:595-601.
122. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thromb Res* 2002; 107:45-49.
123. Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* 2000; 31:591-595.
124. Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999; 155:1281-1291.
125. Patrignani P, Sciulli MG, Manarini S, Santini G, Cerletti C, Evangelista V. COX-2 is not involved in thromboxane biosynthesis by activated human platelets. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50:661-667.
126. Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* 1999; 353:900.
127. Burch JW, Stanford N, Majerus PW. Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. *J Clin Invest* 1978; 61:314-319.

128. De Caterina R, Giannessi D, Boem A, et al. Equal antiplatelet effects of aspirin 50 or 324 mg/day in patients after acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1985; 54:528-532.
129. Roth GJ, Calverley DC. Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood* 1994; 83:885-898.
130. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Baggish JS, Bhatt DL, Topol EJ. Analysis of risk of bleeding complications after different doses of aspirin in 192,036 patients enrolled in 31 randomized controlled trials. *Am J Cardiol* 2005; 95:1218-1222.
131. Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR, Penney DW, Schuler JJ, McClelland TJ, Brace LD. Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke* 1993; 24:345-350.
132. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, Brace LD. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 2331-2336.
133. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, et al. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PIA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalpha) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1115-1119.
134. Lee PY, Chen WH, Ng W, Cheng X, Kwok JY, Tse HF, Lau CP. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 2005; 118:723-727.
135. Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I. Aspirin nonresponsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2002; 108:37-42.
136. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics: McGraw-Hill Professional; 2005.
137. Hung J, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995; 92:2432-2436.
138. Grotemeyer KH. Effects of acetylsalicylic acid in stroke patients. Evidence of nonresponders in a subpopulation of treated patients. *Thromb Res* 1991; 63:587-593.

139. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:961-965.
140. Pulcinelli FM, Pignatelli P, Celestini A, Riondino S, Gazzaniga PP, Violi F. Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:979-984.
141. Alexander JH, Harrington RA, Tuttle RH, et al. Prior aspirin use predicts worse outcomes in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes. PURSUIT Investigators. Platelet IIb/IIIa in Unstable angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. *Am J Cardiol* 1999; 83:1147-1151.
142. Santopinto J, Gurfinkel EP, Torres V, et al. Prior aspirin users with acute non-ST-elevation coronary syndromes are at increased risk of cardiac events and benefit from enoxaparin. *Am Heart J* 2001; 141:566-572.
143. López-Farré AJ, Mateos-Cáceres P, Sacristán D, Azcona L, Bernardo E, Perez de Prada T, Alonso-Orgaz S, Fernández-Arquero M, Fernández-Ortiz A, and Macaya C. Relationship between Vitamin D Binding Protein and Aspirin Resistance in Coronary Ischemic Patients: A Proteomic Study. *J Proteome Res* 2007; 2481-2487.
144. Gomme PT, Bertolini J. Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends Biotechnol* 2004; 22:340-345.
145. Robbins RA, Hamel FG. Chemotactic factor inactivator interaction with Gc-globulin (vitamin D-binding protein). A mechanism of modulating the chemotactic activity of C5a. *J Immunol* 1990; 144:2371-2376.
146. Kew RR, Fisher JA, Webster RO. Co-chemotactic effect of Gc-globulin (vitamin D binding protein) for C5a. Transient conversion into an active co-chemotaxin by neutrophils. *J Immunol*. 1995; 155:5369-5374.
147. Zhang J, Kew RR. Identification of a region in the vitamin D-binding protein that mediates its C5a chemotactic cofactor function. *J Biol Chem*. 2004; 279:53282-53287.
148. Mateos-Cáceres P, García-Méndez A, López-Farré A, Macaya C, Nuñez A, Gomez J, Alonso-Orgaz S, Carrasco C, de Andrés R, Granizo J J, Farré J, Rico L, *A J Am Coll. Cardiol* 2004; 44:1578-1583.

149. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:961-965.
150. Grundmann K, Jaschoned K, Kleine B, Dichgans J, Topka H. Aspirin non-responders status in patients with recurrent cerebral ischaemic attacks. *J Neurol* 2003; 250:63-66.
151. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournie B, Vyas SN, Fitz Gerald GA. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001; 345:1809-1817.
152. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:961-965.
153. Lee P-Y, Chen W-H, Ng W, Cheng X, Kwok J Y-Y, Tse H-F, et al. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2005; 723-727.
154. Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuelian D, Monbouquette R, Reisman M, Gray W, et al. Incidence of aspirin nonresponsiveness using the Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA. *Am JCardiol.* 2003; 92:1492-1494.
155. Yilmaz MB, Balbay Y, Caldir V, Ayaz S, Guray Y, Guray U, et al. Late saphenous vein graft occlusion in patients with coronary bypass: Possible role of aspirin resistance. *Thromb Res.* 2005; 115:25-29.
156. Pamucku B, Oflaz H, Oncul A, Umman B, Mercanoglu F, Ozcan M, et al. The role of aspirin resistance on outcome in patients with acute coronary syndrome and the effect of clopidogrel therapy in the prevention of major cardiovascular events. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 22:103-110.
157. Berrouschot J, Schwetlick B, Von Twickel G, Fisher C, Uhlemann H, Siegemund T, et al. Aspirin resistance in secondary stroke prevention. *Acta Neurol Scand* 2006; 113:31-35.
158. Chen W-H, Lee P-Y, Ng W, Tse H-F, Lau Ch-P. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after nonurgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1122-1126.

159. Snoep JD, Hovens MMC, Eikenboom JCJ, Van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events. *Arch Intern Med* 2007; 167:1593–1599.
160. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacovello L, De Gaetano G, Cerletti CH. PFA-110 closure to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: A meta-analysis of 19 studies comprising 3,003 patients. *Thromb Haemost* 2008; 99:1129–1131.
161. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin « resistance » and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *Br Med J* 2008; 336:195-198.
162. Chakraborty K, Khan GA, Banerjee P, Ray U, Sinha AK. Inhibition of human blood platelet aggregation and the stimulation of nitric oxide synthesis by aspirin. *Platelets* 2003; 14:421-427.
163. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990; 101:325-328.
164. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100:350-356.
165. Freedman JE, Ting B, Hankin B, Loscalzo J, Keaney JF Jr, Vita JA.. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 1998; 98:1481-1486.
166. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004; 134:2842S-47S.
167. Brunini T, Moss M, Siqueira M, Meirelles L, Rozentul A, Mann G, et al. Inhibition of l-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and N-monomethyl-l-arginine: effects of arterial hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31:738-740.
168. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999; 99:2864-2870.

169. Boo YC, Kim HJ, Song H, Fulton D, Sessa W, Jo H. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. *Free Radic Biol Med* 2006; 411:44-53.
170. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM.. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399:601-605.
171. Furman ML, Gardner TM, Goldschmidt-Clermont PJ. Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation. *Thromb Haemostasis* 1993; 70:229-232.
172. Gerlacit E, Nees £ Becker. The vascular endothelium: a survey of some newly involving biochemical and physiological features. *Basic Res Cardiol* 1985; 80:459-474.
173. Jaffe EA. Physiologic functions of normal endothelial cells. *An N Y Acad Sci* 1985; 454:279-291.
174. Scott Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquero DC, Vanhoutte PM. Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. *Circ Res* 1992; 71:1088-1100.
175. Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. *Haemostasis and Thrombosis*, 3rd ed, Vol 1 Edinburg: Churchill Livingstone; 1994; 259-285.
176. Lüscher TF. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension* 1990; 15:482-485.
177. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The platelet derived growth factor. *Cell* 1986; 46:155-164.
178. Kubes P, Suzuki A, Granger DN. Nitric oxide: atn endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:587-590.
179. *J Biol Chem* 1996 269: 21644-21649.
180. *Biochemistry* 1995 34: 5627-5634
181. Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:339-359.
182. Griscavage JM, Fukuto JM, Komori Y, Ignarro LJ. Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group.

- Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269(34):21644–21649.
183. Sagami I, Daff S, Shimizu T. Intra-subunit and inter-subunit electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase: effect of calmodulin on heterodimer catalysis. *J Biol Chem* 2001; 276(32):30036–30042.
184. Siddhanta U, Wu C, Abu-Soud HM, Zhang J, Ghosh DK, Stuehr DJ. Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *J Biol Chem* 1996; 271(13):7309–7312.
185. Lekakis JP, Papathanassiou S, Papaioannou TG, et al. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol* 2002; 86(2–3):317–323.
186. Quyyumi AA, Dakak N, Mulcahy D, et al. Nitric oxide activity in the atherosclerotic human coronary circulation. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29(2):308–317.
187. Loscalzo J. What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 2000; 101(18):2126–2129.
188. Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991; 83(3):1057–1062.
189. Wilson AM, Harada R, Nair N, Balasubramanian N, Cooke JP. L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation* 2007; 116(2):188–195.
190. Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R, et al. Oral L-arginine in patients with coronary artery disease on medical management. *Circulation* 2000; 101(18):2160–2164.
191. Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997; 100(12):3131–3139.
192. Murohara T, Witzendichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(5):1156–1161.

193. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998; 101(11):2567-2578.
194. Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991; 138(1):213-221.
195. Houston DS, Buchhaamn MR. Insuficiencia de endothelium derived relaxing factor on platelets funcion and hemostasis in vivo. *Trom Res* 1994; 74:25.
196. Polamowska G. Role of ciclic nucleotides in rapid platelets adhesion to collagen. *Bloos* 1994; 83:2508.
197. Adams MR, Foryth C, Rombinson J. Oral L-arginine in humans: effects on platelets aggregation hemodynamics and endothelium-dependient dilation. *Circulation* 1994; 1:138.
198. Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995; 125:370–377.
199. Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L et al. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br J Pharmacol* 1999; 126:1872–1880.
200. Queen LR, Xu B, Horinouchi K, Fisher I, Ferro A. beta(2)-adrenoceptors activate nitric oxide synthase in human platelets. *Circ Res* 2000; 87:39–44.
201. Ritter JM, Ferro A, Chowienczyk PJ. Relation between beta-adrenoceptor stimulation and nitric oxide synthesis in vascular control. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62:109–113.
202. Maliski MW. Direct electrochemical measurement of nitric oxide release from human platelets. *Biochem Biophy Res Commun* 1993; 194-960.
203. Riba R, Sharifi M, Farndale RW, Naseem KM. Regulation of platelet guanylyl cyclase by collagen: evidence that Glycoprotein VI mediates platelet nitric oxide synthesis in response to collagen. *Thromb Haemost* 2005; 94(2):395-403.

204. Bode-Böger SM, Böger RH. Creutzinng L-arginine infusion decreases peripherid arterial resistence and inhibits paltelets aggregation in subjects. *Clin Sci* 1994; 87:303.
205. Belder A, Radomski M, Hanocok V. Megacariocytes from patients with coronary atherosclerosis express the inducible nitric oxide synthase. *Atheroscler Thromb Vase Biol* 1995; 15:687.
206. Clutton P, Miermont A, Freedman JE. Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:187–192.
207. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A., Tangphao O, Tsao PS, Chan JR, Blaschke TF, Cooke JP. ADMA: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98:1842–1847.
208. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323:22–27.
209. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88:2149–2155.
210. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993; 88:2510–2516.
211. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997; 95:1119–1121.
212. Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, Donald AE, Palacios M, Griffin GE. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation* 2000; 102:994–999.
213. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339:572–575.

214. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am J Physiol* 1995; 268: H2224–H2231.
215. Faraci FM, Brian JE, Heistad DD. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1995; 269:H1522–H1527.
216. Segarra G, Medina P, Ballester RM, Lluch P, Aldasoro M, Vila JM, Lluch S, Pelligrino DA. Effects of some guanidino compounds on human cerebral arteries. *Stroke* 1999; 30:2206–2211.
217. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 (suppl. 12):S60–S62.
218. Fickling SA, Leone AM, Nussey SS, Vallance P, Whitley GSJ. Synthesis of NG,NG-dimethylarginine by human endothelial cells. *Endothelium*1993; 1:137–140.
219. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999; 343:209–214.
220. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99:3092–3095.
221. MacAllister RJ, Parry H., Kimoto MT, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119:1533–1540.
222. Lin PS, Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine enhances superoxide production in human endothelial cells. *Circulation* 1997; 96 (suppl.): I-45 (abs.).
223. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stühlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M., Vallance P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003; 108:3042–3047.

224. Calver A, Collier J, Leone A, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens* 1993; 7:193–194.
225. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolised by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1455–1459.
226. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger S, Tsikas D, Frölich JC, Höper MM, Haller H, Frölich JC. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109:172–177.
227. Böger RH. The emerging role of ADMA as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003; 59:824–833.
228. Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ. Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem Sci* 1998; 23:89–91.
229. Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patient: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2008; 6:444-450.
230. Grinstein J, Cannon CP. Aspirin resistance: current status and role of tailored therapy. *Clin Cardiol*. 2012; 35:673-681.
231. Bernardo E, Angiolillo DJ, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabate M, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banuelos C, Costa MA, Bass TA, Pignatti PF, Macaya C, Fernandez-Ortiz A. Lack of association between gene sequence variations of platelet membrane receptors and aspirin responsiveness detected by the PFA-100 system in patients with coronary artery disease. *Platelets* 2006; 17(8):586-590.
232. Zamorano-León JJ, Alonso-Orgaz S, Moreno J, Cinza R, García-Torrent MJ, Pérez-Castellano N et al. Novel mutation (H402R) in the S1 domain of KCNH2-encoded gene associated with long QT syndrome in a Spanish family. *Int J Cardiol* 2010; 142:206-208.
233. Salvemini D, de Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86:6328-6332.

234. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158:348-352.
235. Palacios M, Knowles RG, Palmer RMJ, Moncada S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165:802-809.
236. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem J* 1990, 269, 207-210.
237. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 1987, 92, 181-187.
238. Ware JA, Johnson PC, Smith M, Salzman EW. The effect of common agonists on cytoplasmic ionized calcium concentration in platelets: measurement with quin2 and aequorin. *J Clin Invest* 1986, 77, 878-886.
239. Busse R, Luckhoff A, Bassenge E. Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation. *Naunyn-Schmeidebergs Arch Pharmacol* 1987; 336:566-571.
240. Lages B, Weiss HJ. Enhanced increases in cytosolic Ca²⁺ in ADP-stimulated platelets from patients with delta-storage pool deficiency--a possible indicator of interactions between granule-bound ADP and the membrane ADP receptor. *Thromb Haemost.* 1997; 77(2):376-82.
241. Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 1995;57:2049-2055
242. Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman J, Islam N, Ullman HL, Eiroa AM, Aznar J. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest* 1991; 87:571-580.
243. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RMJ, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 1992; 85:2284-2290.
244. Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991; 83:1057-1062.

245. Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A, Frölich JC. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 1995; 117:273–284.
246. Böger RH., Bode-Böger SM, Phivthong-ngam L, Böhme M, Brandes RP, Mügge A, Frlich JC. Dietary L-arginine slows the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits—comparison with lovastatin. *Circulation* 1997; 96:1282–1290.
247. Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:44–50.
248. Tsao PS, Theilmeier G, Singer AH, Leung LL, Cooke JP. L-Arginine attenuates platelet reactivity in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1529–1533.
249. Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 1994; 89:2176–218.
250. Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S, Nafe R, Stan AC, Frölich JC. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular leukocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1998; 136:67–77.
251. Mügge A, Harrison DG. L-Arginine does not restore endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbit aorta in vitro. *Blood Vessels* 1991; 28:354–357.
252. Pollock JS, Försterman U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10480–10484.
253. Böger RH, Bode-Böger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol* 2001; 41 79–99.
254. Jeserich M, Münzel T, Just H, Drexler H. Reduced plasma L-arginine in hypercholesterolemia. *Lancet* 1992; 339: 561.

255. Tsikas D, Böger RH, Sandmann J, Bode-Böger SM, Frölich JC. Hypothesis: endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett.* 2000; 23810: 1–3.
256. McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 2000; 275:6123-6128.
257. Russo I, Doronzo G, Mattiello L, De Salve A, Trovati M, Anfossi G. The activity of constitutive nitric oxide synthase is increased by the pathway cAMP/cAMP-activated protein kinase in human platelets. New insights into the antiaggregating effects of cAMP-elevating agents. *Thromb Res* 2004; 114:265–273.
258. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2001; 88:68–75.
259. Dosenko VE, Zagoriy VY, Lutay YM, Parkhomenko AN, Moibenko AA. Allelic polymorphism in the promoter (T-->C), but not in exon 7 (G-->T) or the variable number tandem repeat in intron 4, of the endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with acute coronary syndrome in the Ukrainian population. *Exp Clin Cardiol* 2006; 11:11-3.
260. Cardaropoli S, Silvagno F, Morra E, Pescarmona GP, Todros T. Infectious and inflammatory stimuli decrease endothelial nitric oxide synthase activity in vitro. *J Hypertens.* 2003; 21:2103-10.
261. Williams RH, Nollert MU. Platelet-derived NO slows thrombus growth on a collagen type III surface. *Thrombosis J* 2004; 2:11.
262. Mateos-Cáceres PJ, Macaya C, Azcona L, Modrego J, Mahillo E, Bernardo E et al. Different expression of proteins in platelets from aspirin-resistant and aspirin-sensitive patients. *Thromb Haemost* 2010;103:160-70
263. López-Farré AJ, Zamorano-Leon JJ, Azcona L, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ, González-Armengol J, Villarroel P, Moreno-Herrero R, Rodríguez-Sierra P, Segura A, Tamargo J, Macaya C. Proteomic changes related to "bewildered" circulating platelets in the acute coronary syndrome. *Proteomics* 2011; 11(16):3335-3348.

264. Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997; 272:18522-18525.
265. Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; 27:154-158.

ANEXO