

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

La respuesta de la plaqueta a la aspirina determina la capacidad apoptótica plaquetar

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Martin Gascón Hove

DIRECTORES

Antonio José López Farré
José Javier Zamorano León

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

La respuesta de la plaqueta a la aspirina determina la capacidad apoptótica plaquetar

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

MARTÍN GASCÓN HOVE

DIRECTOR

ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ
JOSÉ JAVIER ZAMORANO LEÓN

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Programa de Doctorado:

Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas



La respuesta de la plaqueta a la aspirina determina la capacidad apoptótica plaquetar

Tesis doctoral que presenta

MARTÍN GASCÓN HOVE

Bajo la dirección de los doctores

ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ

JOSÉ JAVIER ZAMORANO LEÓN

MADRID

2019

**LA RESPUESTA DE LA PLAQUETA A LA
ASPIRINA DETERMINA LA CAPACIDAD
APOPTÓTICA PLAQUETAR**

Tesis doctoral que presenta
MARTÍN GASCÓN HOVE

Bajo la dirección de los doctores
ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ
JOSÉ JAVIER ZAMORANO LEÓN

MADRID


2019

D. Antonio José López Farré, profesor titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que don Martín Gascón Hove ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado «La respuesta de la plaqueta a la aspirina determina la capacidad apoptótica plaquetar», con objeto de obtener el grado de Doctor en Medicina.

Y, para que conste, expide el presente certificado en Madrid, a 1 de octubre de 2019.



Dr. Antonio José López Farré.

D. José Javier Zamorano León, profesor ayudante doctor del Departamento de Salud Pública y Maternoinfantil de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que don Martín Gascón Hove ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado «La respuesta de la plaqueta a la aspirina determina la capacidad apoptótica plaquetar», con objeto de obtener el grado de Doctor en Medicina.

Y, para que conste, expide el presente certificado en Madrid, a 1 de octubre de 2019.


Dr. José Javier Zamorano León.

Til mor. Altid i vores hjerter

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Jesús Manuel Peraza Casajús, teniente coronel, compañero y amigo. Por ser un ejemplo en su tesón y esfuerzo, y por haber luchado tanto para que pudiese presentar una tesis doctoral. Sencillamente, sin él no existiría este libro.

Al doctor Antonio José López Farré, por apoyarme y haber dedicado su tiempo cuando yo no disponía del mío. Por haberme transmitido su pasión a la hora de embarcarme en este proyecto. Por ser una de esas personas que hacen fácil lo difícil.

Al doctor José Javier Zamorano León, por haberme allanado tanto el camino.

A Begoña Larrea Cruz, por esa sonrisa permanente como respuesta a mis peticiones.

A todos los que nos han precedido en el descanso eterno. Se fueron demasiado pronto, pero su poderosa presencia permanece en nuestra memoria y en el ejemplo que cincelaron en nuestro carácter.

A mis maestros, que tanto me enseñaron. Buena parte de este trabajo ha sido fruto de sus lecciones.

A Jesús Ángel Garijo Álvarez, mi padre en Cirugía, por hacerme debutar en Primera División.

A Guillermo Carroquino Rodríguez, coronel médico, jefe de asistencia sanitaria del cuartel general de la Armada, por estar siempre dispuesto, contra viento y marea, a velar por sus subordinados sin tener en cuenta las consecuencias derivadas por ello.

A Vanesa Medina Herrero y a Yannick L'Hénaff, por su permanente disponibilidad para ayudar.

A mis amigos, en especial a Rogelio, Luz Benilde, Carlos y Diego, monegrinos. Por la nobleza. Por todos los momentos pasados. Por la amistad.

A toda mi familia, porque llevar ese apellido me llena de orgullo. Por todas las enseñanzas que me ha transmitido. Por hacerme ser consciente de que nunca falla. Porque ser un Gascón es no estar siempre, sino siempre que hace falta estar.

A mis tíos Aurora y Juan, por ser el vivo ejemplo terrenal de que nunca hay que rendirse.

A mis tíos María Josefa y Jesús, por demostrarme cada día que la grandeza del corazón humano es ilimitada.

A mis primos Jesús, Ana, Sara, Elisa y José Antonio. Porque, en la distancia, el cariño crece.

A Elena, prima y ahijada, por esa maravillosa forma de ser.

A María Asunción, por esa alegría que destila a pesar de las dificultades. Por ser capaz de hacerme sentir su presencia un día de Navidad en la Antártida. Porque sabe arrancarme una sonrisa en el peor de los momentos.

A mi padre, por aquel «Contigo hasta la muerte», en el momento en el que más lo necesitaba.

A Martina y Pilar porque, en las noches oscuras, las estrellas más audaces bajan del cielo para posarse en sus ojos.

Este estudio fue financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (PI17/01408), con la colaboración del proyecto Genobia.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	18
2. ABSTRACT	21
3. INTRODUCCIÓN.....	24
3.1. Plaqueta y enfermedad coronaria	25
3.2. Historia de la aspirina.	27
3.3. Mecanismo de acción de la aspirina en la plaqueta	34
3.4. Concepto de síndrome de resistencia a la aspirina: mecanismos implicados y repercusión clínica	36
3.5. Polimorfismos y resistencia	46
3.6. Inflamación y resistencia	48
3.7. Resistencia en el síndrome metabólico	49
3.8. Impacto clínico y terapéutico de la resistencia.	49
3.9. Manejo de la resistencia	52
4. HIPÓTESIS.....	55
5. OBJETIVOS	57
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
6.1. Expresión proteica	61
6.2. Medición de nitrito + nitrato y TXA2	62
6.3. Actividad de la caspasa-3	63
6.4. Determinación de la liberación de citocromo c al citosol	63
6.5. Pacientes con plaquetas sensibles y resistentes al AAS	64
6.6. Análisis estadístico	65

7. RESULTADOS.....	67
7.1. Contenido y receptores de TXA2 y expresión de ONS3 en plaquetas neoformadas.	68
7.2. Expresión del estrés oxidativo y de proteínas proapoptóticas asociadas en las plaquetas neoformadas.	70
7.3. Proteínas proapoptóticas en plaquetas sensibles y resistentes al AAS	72
8. DISCUSIÓN	76
9. COMENTARIOS Y LIMITACIONES	94
10. CONCLUSIONES	98
11. BIBLIOGRAFÍA	100

Índice de figuras

Figura 1. Principales agonistas y proteínas de adhesión que participan en el proceso de activación plaquetaria.	25
Figura 2. Arthur Eichengrün.	29
Figura 3. Félix Hoffmann.	30
Figura 4. John Vane.	31
Figura 5. Activación plaquetar.	35
Figura 6. PFA-100: analizador de la función plaquetar PQ-100.	40
Figura 7. Citometría de flujo para identificar la presencia de partículas <i>platelet-like</i> (PPL) en las muestras. A la izquierda se aprecia la muestra de PPL y, a la derecha, la de megacariocitos.	61
Figura 8. Contenido de tromboxano A2 (TXA2) y liberación de óxido nítrico medido como nitrito + nitrato por las partículas <i>platelet-like</i> obtenidas de megacariocitos incubados en presencia o ausencia de ácido acetilsalicílico (AAS).	68
Figura 9. Expresión del receptor del tromboxano A2 (RTXA2) y de óxido nítrico sintasa 3 (ONS3) en partículas <i>platelet-like</i> obtenidas de megacariocitos expuestos y no expuestos al ácido acetilsalicílico (AAS).	69
Figura 10. Expresión de superóxido dismutasa (SOD), Bax, Bak y gp91-phox NADPH oxidasa en partículas <i>platelet-like</i> obtenidas de megacariocitos expuestos y no expuestos al ácido acetilsalicílico (AAS).	70
Figura 11. Liberación de citocromo c en el citosol en partículas <i>platelet-like</i> obtenidas de megacariocitos expuestos y no expuestos al ácido acetilsalicílico (AAS).	71
Figura 12. Expresión de proteínas proapoptóticas en plaquetas sensibles y resistentes al ácido acetilsalicílico (AAS)..	73

Figura 13. Actividad de la caspasa-3 y contenido citosólico de citocromo c en plaquetas sensibles y resistentes al ácido acetilsalicílico (AAS) estimuladas con ionóforo de calcio.	75
Figura 14. Síntesis y efectos del óxido nítrico (NO) sobre las plaquetas.	78
Figura 15. Interacción neutrófilo-plaqueta.....	79
Figura 16. Vías de apoptosis celular.....	87

Índice de tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los test para determinar la resistencia	39
Tabla 2. Causas de resistencia.	43
Tabla 3. Características clínicas de los pacientes de los que se obtuvieron plaquetas sensibles y resistentes al ácido acetilsalicílico (AAS)	72
Tabla 4. Características de los pacientes con plaquetas sensibles y resistentes al ácido acetilsalicílico (AAS) usadas en experimentos realizados con ionóforo de calcio. .	74

1. RESUMEN

Introducción

El ácido acetilsalicílico (AAS) ha demostrado ser eficaz en la prevención de efectos trombóticos cardiovasculares. A pesar del conocimiento de la reducción de riesgo de trombosis en prevención secundaria en pacientes sometidos a tratamiento con AAS, algunos pacientes no obtienen todos los beneficios de sus efectos antiagregantes. Este concepto se conoce como resistencia a la aspirina. Su mecanismo continúa siendo desconocido y probablemente sea multifactorial.

Material y métodos

Se analizó si la presencia de AAS en los megacariocitos puede, en las plaquetas formadas *de novo*, afectar a su capacidad para producir óxido nítrico (ON) y tromboxano A₂ (TXA₂), al sistema de generación del anión superóxido (SO) y/o al nivel de expresión de proteínas proapoptóticas. Las células Meg-01, pertenecientes a una línea celular megacarioblástica humana, fueron estimuladas para formar plaquetas (partículas *platelet-like* (PPL)) con 10 nmol/l de forbol 12-miristato-13-acetato en presencia y en ausencia de AAS (0,33 mmol/l).

Resultados

Las PPL generadas a partir de células Meg-01 expuestas al AAS presentaron un contenido superior de ON sintasa 3 (ONS3) asociado a una liberación mayor de nitratos y nitritos que las PPL derivadas de células Meg-01 no expuestas. Las PPL derivadas de células

Meg-01 expuestas al AAS también presentaron una menor expresión de gp91-phox NADPH oxidasa y una expresión superior tanto de Mn-SO dismutasa (SOD) como de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak. En la segunda parte del estudio, observamos que las plaquetas sensibles al AAS de pacientes con isquemia coronaria estable tratados con 100 mg diarios de AAS presentaron una expresión mayor de Bax y Bak que las plaquetas resistentes al AAS. El ionóforo de calcio aumentó la actividad de la caspasa-3 y los niveles citosólicos de citocromo c en plaquetas sensibles al AAS en comparación con las resistentes.

Conclusiones

La exposición de megacariocitos al AAS produjo nuevas PPL que evidenciaron cambios en los niveles de proteínas asociadas a la funcionalidad plaquetar, incluyendo proteínas relacionadas con la apoptosis. En comparación con las plaquetas resistentes al AAS, las plaquetas sensibles de pacientes coronarios también presentaron una expresión superior de Bax y Bak, que tras la estimulación con ionóforo de calcio se acompañó de una presencia superior de mecanismos proapoptóticos asociados. Estos resultados pueden estar mostrando un nuevo mecanismo de acción del AAS sobre las plaquetas.

2. ABSTRACT

Introduction

Acetylsalicylic acid (ASA) has shown benefits on prevention of cardiovascular thrombotic events. In spite of the knowledge of the reduction of thrombotic risk in secondary prevention in patients undergoing ASA treatment, some patients may not obtain the full benefits of its antiplatelet effects. This concept is known as aspirin resistance. Its mechanism remains uncertain and is also probably multifactorial.

Material and methods

It was analyzed if the presence of ASA in megakaryocytes may in the newly formed platelets affect their ability to produce nitric oxide (NO) and thromboxane A₂ (TXA₂), the superoxide anion (SO) generation system and/or the expression level of proapoptotic-related proteins. Meg-01 cells, a human megakaryoblastic cell line, were stimulated to form platelets (platelet-like particles (PLPs)) with 10 nmol/l of phorbol 12-myristate-13-acetate in the presence and in the absence of ASA (0,33 mmol/l).

Results

PLPs from ASA-exposed Meg-01 cells showed higher content of NO synthase 3 (NOS3) protein associated with higher PLPs nitrite + nitrate release than those PLPs from Meg-01 cells unexposed to ASA. PLPs from ASA-exposed Meg-01 cells also showed lower expression of gp91-phox NADPH oxidase and higher expression of either Mn-SO dismutase

(SOD) and the proapoptotic proteins Bax and Bak. In a second part of the study, we observed that ASA-sensitive platelets from patients with stable coronary ischemia treated with daily 100 mg ASA showed higher expression of both Bax and Bak proteins than ASA-resistant platelets. Calcium ionophore increased both caspase-3 activity and cytosolic cytochrome c levels in ASA-sensitive with respect to ASA-resistant platelets.

Conclusions

Exposure of megakaryocytes to ASA produced new PLPs showing changes in the level of proteins associated with platelet functionality including proapoptotic-related proteins. Compared with ASA-resistant platelets, ASA-sensitive platelets from coronary patients also showed higher Bax and Bak expression, that after stimulation with calcium ionophore was accompanied with greater stimulation of proapoptotic-associated mechanisms. These results may be opening a new mechanism of action of ASA on platelets.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Plaqueta y enfermedad coronaria

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos de un tamaño de 1-2 μm carentes de núcleo, como los glóbulos rojos, y juegan un papel preponderante en la trombosis y en la curación de heridas. Se generan a partir de los bordes de los megacariocitos, células grandes y poliploideas, que se encuentran en la médula ósea y en el bazo, por fragmentación. En el torrente sanguíneo las plaquetas viven alrededor de diez días antes de ser destruidas por el sistema reticuloendotelial del hígado y del bazo, principalmente. Su intervalo fisiológico es de 150.000-400.000 por ml. En condiciones normales circulan de forma inactiva y expresan en su superficie moléculas que, al ser activadas, facilitarán su interacción con otras plaquetas y células (figura 1).

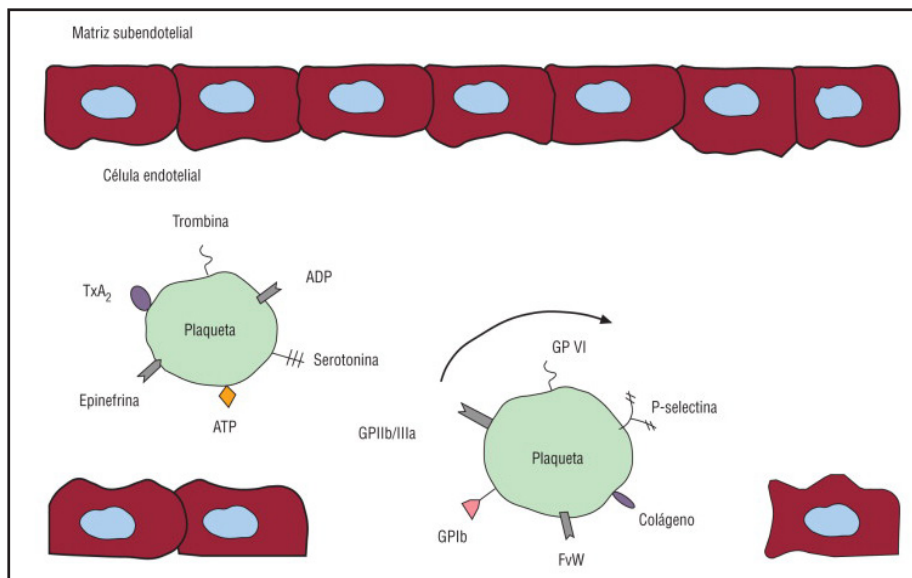


Figura 1. Principales agonistas y proteínas de adhesión que participan en el proceso de activación plaquetaria.

TxA₂: tromboxano A₂. GP: glicoproteína. FvW: factor Von Willebrand. ADP: difosfato de adenosina. ATP: trifosfato de adenosina (López Farré A).

En su interior existen gránulos alfa, gránulos densos y lisosomas. Al activarse, todos ellos liberan factores que estimulan la actividad de la propia plaqueta y de las células de su entorno. Los gránulos alfa contienen P-selectina, y son reservorios de factores de crecimiento y moléculas de adhesión o receptores para facilitar la interacción con otras células. Los gránulos densos, por el contrario, contiene difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), serotonina y calcio. Este último es necesario para la formación de fibrina en el trombo. Finalmente, los lisosomas son ricos en elastasas y proteasas que facilitan la degradación de la matriz extracelular¹.

Las plaquetas juegan un papel primordial en la patogenia de la enfermedad vascular al unirse a las placas arterioscleróticas inestables². Sin embargo, también se ha demostrado su importancia en respuestas inmunes e inflamatorias³. Y, a pesar de ser anucleadas, poseen ARNm, ARNm_i y otras moléculas que regulan el proceso postranscripcional⁴.

El término adhesión hace referencia a la unión de la plaqueta con cualquier célula que no sea un trombocito, mientras que la agregación se produce exclusivamente entre dos plaquetas. Por tanto, la adhesión de plaquetas al subendotelio, su agregación y reclutamiento propician la génesis de un trombo, descrito hoy en día como un fenómeno multicelular: la interacción entre endotelio, plaquetas y neutrófilos regula el crecimiento del trombo neoformado.

La formación del trombo dentro del vaso coronario es el factor precipitante en el infarto agudo de miocardio (IAM) y la angina inestable. En condiciones normales el endotelio intacto previene la adhesión plaquetar y su posterior activación gracias a numerosos procesos, como la producción de óxido nítrico (ON) y prostaglandina (PG) I₂, también llamada prostaciclina. Cuando el endotelio está lesionado o es disfuncionante y pierde sus propiedades antitrombóticas, expone colágeno y factor Von Willebrand (FvW) a las plaquetas, las cuales se adhieren

directamente al colágeno o, indirectamente, a través del FvW a la glicoproteína (GP) Ib. La activación local de las plaquetas estimula la formación del trombo y la captación de nuevas plaquetas al ayudar a formar trombina y liberar agonistas plaquetares potentes como ADP, serotonina o tromboxano (TX) A₂. El trombo se irá desarrollando al agregarse las plaquetas gracias a la GPIIb/IIIa. Además, en la adhesión intervienen diversos factores que actúan desde la superficie disfuncionante o lesionada, bien frenando directamente las plaquetas circulantes o bien haciendo que éstas expresen proteínas frenadoras en su superficie. La P-selectina descrita previamente es un ejemplo de proteína frenadora. Dado que la activación plaquetar es crucial en la patogenia de la isquemia miocárdica, se han ido desarrollando estrategias farmacológicas para evitar dicha activación. En este sentido, la aspirina sigue liderando la lista de medicamentos utilizados para prevenir y reducir la lesión isquémica⁵.

3.2. Historia de la aspirina

Hay que remontarse hasta las primeras civilizaciones para identificar los primeros vestigios del uso del ácido acetilsalicílico (AAS) en la medicina tradicional. Sumerios y egipcios utilizaban la corteza del sauce por sus propiedades analgésicas, ignorando que eran debidas a la presencia de salicina⁶. Cuatrocientos años antes de Cristo, Hipócrates de Cos aplicaba hojas de sauce en partos en la Antigua Grecia, y su uso se extendió al Imperio Romano, tal y como describió Plinio el Viejo^{7,8}. Sin embargo, hubo que esperar hasta el siglo XIX para poder demostrar su utilización como antipirético y antiinflamatorio en épocas antiguas: Edwin Smith (1822-1906), un hombre de negocios norteamericano que vivía en El Cairo, adquirió unos documentos antiguos que se remontaban a 1500 a. C. en los que se hablaba de los poderes curativos de diversos representantes del Reino Vegetal. Uno de ellos se citaba como *Salix* (hoy en día, sauce) y se recomendaba en dolores inespecíficos.

En 1763, el reverendo Edward Stone, de la Universidad de Oxford, describió la aplicación de la corteza de sauce en casos de fiebre y escalofríos. Posteriormente, dejó secar la corteza junto a un horno durante tres meses y la convirtió en polvo que administró a cincuenta pacientes, con una notable tasa de respuestas positivas. Su publicación posterior en una carta fue, con toda probabilidad, el motor que incentivó a muchos médicos a imitarlo. El ingrediente activo de la corteza del sauce fue descubierto en 1828. Johann Buchner (1783-1852) aisló la salicilina, el glicósido del ácido salicílico y el ingrediente activo de la aspirina, y la describió como amarillenta y amarga. Fue llamada *Salix alba*, literalmente sauce blanco⁹.

Pierre-Joseph Leroux (1795-1870), en Francia, y Raffaele Piria (1814-1865), en Italia, perfeccionaron su composición y, de hecho, este último bautizó el compuesto con el nombre de ácido salicílico.

En 1852 un químico francés, Charles Frédéric Gerhardt (1816-1856), introdujo un grupo acetilo en el ácido salicílico, pero se encontró ante un compuesto inestable y no prosiguió con su estudio.

Casi un cuarto de siglo después, en 1876, Thomas MacLagan (1838-1903) publicó el primer ensayo clínico de la salicina¹⁰. Primero comenzó tomándola él mismo y, al no presentar efectos secundarios, trató satisfactoriamente a ocho pacientes aquejados de fiebre reumática y demostró su poder antiinflamatorio y antipirético, aunque no fue secundado por las complicaciones gástricas.

Una de las fechas clave en la historia de la aspirina es 1890. Una empresa farmacéutica germana, Bayer, puso en marcha un ambicioso proyecto al crear una división en la que se

facilitaban las investigaciones científicas. En esa época varios nombres propios aparecen concomitantemente sin que se pueda, hoy en día, distribuir su grado de importancia en el descubrimiento de la aspirina. Arthur Eichengrün (figura 2) (1867-1949) era el responsable de la división, y decidió desarrollar un derivado del salicilato que no causara irritación gástrica. Encargó la tarea a Felix Hoffmann (figura 3) (1868-1946), que se puso a trabajar con el salicílico obtenido al secar hojas de ulmaria. Acetiló el grupo fenol del ácido y produjo AAS. El hito quedó reflejado en el libro de laboratorio el 10 de agosto de 1897.



Figura 2. Arthur Eichengrün
(Desborough M).

Heinrich Dreser (1860-1924) se encargó de los ensayos clínicos y rechazó el compuesto, alegando que producía taquicardia y palpitaciones. Curiosamente, sólo diez días después del descubrimiento del ácido, Hoffmann produjo un segundo fármaco, la diacetilmorfina, derivada de la morfina, irónicamente bautizada como heroína por las esperanzas depositadas en ella. Eichengrün no estaba de acuerdo con la negativa de Dreser, y realizó por su cuenta ensayos donde demostraba el poder analgésico y la carencia de efectos secundarios del AAS. La respuesta de Dreser pasó a la historia: «Se trata de la típica jactancia berlinesa. El producto carece de valor».



Figura 3. Félix Hoffmann
(Desborough M).

Sin embargo, acabó cediendo: el compuesto se comercializó bajo el nombre de Aspirina, derivado de la conjunción de acetil y *Spirarea*, género latino de la ulmaria. Su consumo creció exponencialmente en muy poco tiempo, al mismo ritmo que la fortuna personal de Dreser¹¹. Por el contrario, la procedencia judía de Eichengrün en la Alemania nazi contribuyó a silenciar su contribución durante décadas. Sólo tras finalizar la Segunda Guerra Mundial, y poco antes de su muerte, pudo publicar un manuscrito en el que señalaba su aportación al descubrimiento¹².



Figura 4. John Vane
(Montinari MR).

Pese al amplio consumo mundial, la aspirina también tuvo que lidiar con varios contratiempos. Tras la aparición de la gastroscopia, pronto fue patente la relación con gastritis¹³. La irrupción del paracetamol en 1956, carente de efectos gástricos, se reflejó en las cifras de ventas. Y, seis años después, Mortimer asoció su consumo con el síndrome de Reye en la población infantil¹⁴. Así, con la excepción del síndrome de Kawasaki, se proscribió la administración de la aspirina a menores de 16 años.

Sin embargo, a la vez que cosechaba grandes éxitos de ventas, el mecanismo de acción continuaba siendo un misterio. Collier (1912-1983) sugirió que inhibía la bradiquinina¹⁵, pero finalmente fue John Vane (figura 4) (1927-2004) el que publicó, en 1971, que la aspirina inhibía la síntesis de una PG, motivo por el cual obtuvo el premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1982, compartido con Samuelsson y Bergstrom. Para entonces ya se conocía que la inhibición plaquetar podía ser crucial a la hora de tratar la formación del trombo¹⁶.

De los elementos que circulan por el torrente circulatorio, las plaquetas fueron los últimos en descubrirse. Fueron descritas por primera vez por Max Schultze en 1865¹⁷. No obstante, también se atribuye este hito al británico George Gulliver o al francés Alfred Donné. Un siglo después, en 1966, se publicó que la aspirina aumentaba el tiempo de hemorragia y que este efecto era particularmente notable en pacientes con enfermedad de Von Willebrand¹⁸. En 1967 Weiss y Aledort sacaron a la luz un estudio en el que demostraron que también disminuía la agregación plaquetar¹⁹. Unos años después, finalmente, se publicó que la aspirina antagonizaba los efectos del TXA2 al inhibir la ciclooxigenasa (COX)²⁰.

Durante la década de los cincuenta, veinte años antes del descubrimiento de su mecanismo de acción, un médico de familia estadounidense, Lawrence Craven (1883-1957), prescribió a los pacientes sometidos a una tonsilectomía chicles impregnados de aspirina, y se dio cuenta

de que muchos de ellos presentaban graves problemas hemorrágicos, por lo que postuló que podía prevenir la trombosis²¹. Paradójicamente, falleció por un IAM, y la comunidad científica cuestionó sus resultados. Sin embargo, existía mucho interés por determinar si realmente poseía un efecto antitrombótico, y varios estudios se publicaron analizando pros y contras de su administración. El Segundo Estudio Internacional de Supervivencia Postinfarto (ISIS-2), tras estudiar a 17 787 pacientes, determinó que el riesgo relativo se reducía en un 20 % a las cinco semanas²². Otros trabajos demostraban que 30-75 mg diarios eran igual de eficaces que dosis superiores para prevenir la isquemia cerebral. En 1994 *British Medical Journal* dedicó 50 páginas a la aspirina y demostró una reducción de accidentes vasculares del 25 %²³. Hoy en día se usa de modo generalizado en la prevención de enfermedad cardiovascular y de accidentes isquémicos y en el tratamiento del IAM.

En cuanto a la trombosis venosa (TV), se ha publicado una reducción de la recurrencia del 32 %, y del 28 % de TV profunda tras cirugía ortopédica, aunque estos efectos son netamente inferiores a los obtenidos con anticoagulantes. Lo mismo ocurre en pacientes con fibrilación auricular. Actualmente su uso se reduce a la profilaxis de TV en pacientes con mieloma múltiple tratados con lenalidomida o talidomida, a la profilaxis de enfermedad cardiovascular en pacientes con policitemia vera y trombocitopenia esencial, y a su administración en la púrpura trombocitopénica, en abortos recurrentes y, ocasionalmente, en el síndrome antifosfolípido.

El 25 % de los pacientes con hemorragia digestiva alta toma algún agente antiplaquetar²⁴. En esos casos se recomienda la transfusión de 2-3 concentrados de plaquetas, aunque estudios recientes aportan datos contradictorios, por lo que actualmente no existe una línea clara de tratamiento en el manejo de estos procesos.

3.3. Mecanismo de acción de la aspirina en la plaqueta

Tras la afectación de la íntima vascular, como ocurre tras un traumatismo o tras la ruptura de una placa arteriosclerótica, el colágeno subendotelial y el FvW son expuestos a la circulación sanguínea. Las plaquetas se unen a ambos en la zona lesionada a través de los receptores de las GP Ia/IIa y Ib/V/IX respectivamente, y provocan así la liberación de calcio²⁵. Éste induce cambios conformacionales en los receptores plaquetares de la GPIIb/IIIa para que se unan al fibrinógeno circulante. Asimismo, también fomenta la liberación de gránulos alfa y densos. Los primeros contienen P-selectina, la cual media en la adhesión de monocitos y neutrófilos, paso previo fundamental para la captación de leucocitos en el trombo neoformado, con lo que se consolida la trombogénesis y todo el proceso hemostático²⁶. Los gránulos densos liberan ADP, que perpetúa la activación plaquetar al unirse a receptores específicos de ADP (P2Y1), y promueve la acción de la fosfolipasa A2 en la membrana fosfolípida para producir ácido araquidónico (ARA), que será convertido en TXA2 a través de la TX sintasa, y PG, a través de las COX 1 y 2. Éstas catalizan el primer paso en la síntesis de prostanoïdes: la conversión del ARA en la PGH2, intermediario inestable y sustrato de varias isomerasas que generan, al menos, cinco prostanoïdes activos, entre ellos TXA2 y PGI2²⁷. El TXA2 es el activador plaquetar más importante al estimular la producción de receptores de fibrinógeno (GPIIb/IIIa) en la membrana, uniéndose a los receptores de la superficie de otras plaquetas y promoviendo su activación²⁸. Además, es un potente vasoconstrictor. Entre otros activadores plaquetares se hallan ARA, fibrinógeno, ADP, estrés, tabaco, lesión endotelial, PGI2 y la cascada de la coagulación (figura 5).

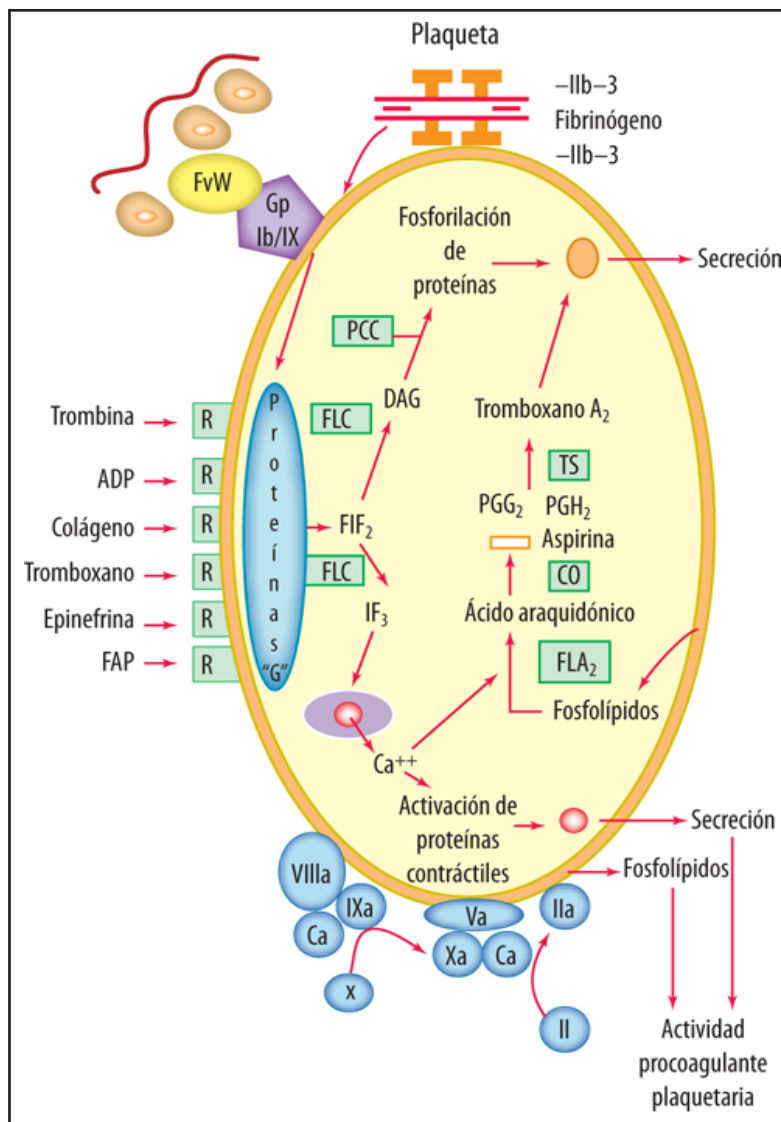


Figura 5. Activación plaquetar.

ADP: difosfato de adenosina. FAP: factor de activación plaquetar. R: receptor. FLA₂: fosfolipasa A₂. Gp: glicoproteína. FvW: factor Von Willebrand. PG: prostaglandina. TS: tromboxano sintasa (Fernández-Tresguerres JA).

La aspirina inhibe irreversiblemente la COX1 acetilando la serina 529 al unirse a un residuo de arginina 120, que se localiza en la región más estrecha del canal del receptor. Así, el ARA no accede al sitio catalítico de la enzima, y se paraliza la síntesis de TXA₂ y otros

productos derivados del ARA. Asimismo, bloquea la COX2 acetilando la serina 516. Las plaquetas, anucleadas, no pueden sintetizar COX1, por lo que el efecto dura hasta la apoptosis (7-10 días). Dicho efecto es rápido, irreversible y dosis-independiente. Una sola dosis de aspirina de 325 mg inhibe completamente la COX1, la cual recobra su actividad a razón de un 10 % diario, debido al vertido en el torrente circulatorio de plaquetas neoformadas. Es detectable en el plasma antes de cumplirse treinta minutos de la ingesta. Tras una dosis única, se alcanza la concentración máxima en una hora, la cual disminuye gradualmente. La vida media es de 2-3 horas a dosis antiplaquetares, gracias a la hidrólisis producida en hígado, plasma y hematíes²⁹. Alrededor de un 85 % del salicilato está unido a la albúmina, aunque este porcentaje disminuye al aumentar su concentración. Hipoproteinemia y competidores de los receptores de la aspirina, entre los que encontramos tiroxina, triyodotironina, fenitoína, sulfpirazonas, bilirrubina, ácido úrico, penicilinas y otros AINE aumentan la concentración de salicilatos libres en plasma.

3.4. Concepto de síndrome de resistencia a la aspirina: mecanismos implicados y repercusión clínica

En hombres de mediana edad, el AAS reduce el riesgo de IAM en un 44 % a 5 años³⁰, y la mortalidad un 23 % cuando se administra junto a terapia trombolítica²². No en vano, la aspirina es el antiagregante más prescrito en la prevención primaria de la enfermedad cerebrovascular y cardiovascular en un amplio segmento de la población³¹. Como muestra, treinta millones de norteamericanos la toman habitualmente. No sólo eso: ha demostrado su utilidad en la prevención secundaria de accidentes isquémicos recurrentes³². Sin embargo, el efecto no es igual en todos los pacientes. Las cifras bailan ostensiblemente en la literatura, pero se calcula que entre 0,4 %-70 % de los pacientes presenta una respuesta antiagregante pobre

que es denominada síndrome de resistencia a la aspirina³³⁻³⁵. Hoy en día este fenómeno sigue sin tener criterios que lo definan plenamente, y así se incluyen diversos efectos:

1. Protección frente a complicaciones clínicas trombóticas arteriales.
2. Prolongación del tiempo de hemorragia.
3. Inhibición de la síntesis de TX.
4. Producción de un efecto precoz en una o más pruebas *in vitro* de la función plaquetar, principalmente la agregación³⁶.

Los parámetros de la resistencia a la aspirina no están totalmente claros para la comunidad científica. Para empezar, algunos autores sugieren que debería denominarse, de modo más exacto, «fallo del tratamiento de la aspirina», dado que no todos los casos de accidentes aterotrombóticos tienen en cuenta el incumplimiento por parte de los pacientes. Otros prefieren hablar de «no respuesta a la aspirina», pues abarca así el fallo de ésta para inhibir la síntesis de TX y la reducción de la agregación.

La resistencia a la aspirina puede ser determinada clínicamente o detectarse en el laboratorio. El primer caso se refiere a la incapacidad del medicamento para prevenir accidentes aterotrombóticos sintomáticos en pacientes tratados con AAS. El segundo, la resistencia determinada por pruebas de laboratorio, se define como el fallo del AAS para inhibir la agregación plaquetar de modo predecible y medible^{37,38}. Potencialmente tiene un mayor valor terapéutico, pues los resultados identificarían a los pacientes de riesgo de accidentes vasculares y permitirían prevenir su morbimortalidad. Las definiciones se refieren tanto a los fracasos de sus efectos farmacológicos como a los de la prevención de la agregación plaquetar. Si hablamos

de los primeros, la resistencia a la aspirina viene definida por la producción persistente de TXA2 a pesar del tratamiento e implica la presencia de sus metabolitos (TXB2 y 11-dehidro-TXB2) en sangre u orina³⁹. La concentración urinaria de este último, sin embargo, puede aumentar en pacientes con ictus e IAM⁴⁰. La persistencia de la agregación define el fracaso de la inhibición plaquetar mediada por la aspirina, que puede deberse a procesos independientes del TXA2. La «no respuesta a la aspirina» se refiere al fallo de ésta para inhibir la síntesis de TX y reducir la agregación, a diferencia de la «resistencia», pues en ocasiones la aspirina inhibe la síntesis de TX pero la agregación persiste. Al hilo de esta cuestión, Weber demostró que existen tres grupos según el comportamiento del AAS, para diferenciar «resistencia» de «no respuesta»³⁶, aunque esta clasificación se halla limitada por el uso único de la agregometría como método de detección. Existe actualmente una arbitrariedad franca en los criterios de laboratorio a la hora de definir la resistencia a la aspirina, y las pruebas tampoco están protocolizadas. Así se explica cómo, utilizando la misma técnica agregométrica, se obtienen porcentajes de resistencia que varían entre el 5,5 %⁴¹ y el 75 %⁴². La definición de no respuesta a la aspirina basada en la función plaquetar y no en la concentración de metabolitos parece ser la más útil, aunque no puede correlacionarse con la clínica antes de establecerse una relación con los resultados de las pruebas realizadas. Es necesario definir los niveles de fallo de la inhibición plaquetar que arrojen valores predictivos. Las variaciones porcentuales pueden ser debidas a que existen diferentes métodos de estudio, distintas definiciones de resistencia y que los tamaños muestrales son pequeños⁴³.

Gum *et al.* demostraron, en un estudio prospectivo de enfermedad vascular, que la respuesta parcial y la no respuesta a la aspirina se asociaban a la edad y al sexo femenino, y no a la raza, diabetes, recuento plaquetar o hepatopatía⁴¹. El tabaco aumenta los niveles séricos de fibrinógeno, y existen estudios poco consistentes que lo relacionan con un aumento de la resistencia⁴⁴.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los test para determinar la resistencia

	Ventajas	Desventajas
Producción de tromboxano		
Tromboxano B2 en suero	Efecto terapéutico dependiente de la inhibición de COX1	Puede no ser específico de la plaqueta. Se requiere experiencia del operador
11 dihidro tromboxano B2 urinario	Dependiente del efecto terapéutico del ácido acetilsalicílico sobre la COX1 Se correlaciona con eventos clínicos	No es específico de la plaqueta Sensibilidad incierta Reproducibilidad incierta No evaluado ampliamente
Tromboxano dependiente de la función plaquetaria		
Agregación óptica o por luz	Estándar de oro Ampliamente disponible Correlacionado con eventos clínicos	No es específico Sensibilidad incierta Reproducibilidad limitada Muy laborioso Resultados dependientes del operador y el intérprete
Agregación de impedancia	Requiere poca preparación de la muestra	No es específico Dependiente del operador y el intérprete
PFA 100 (Platelet Function Analyser)	Simple Rápido Semiautomático Correlacionado con eventos clínicos	Dependiente del factor de von Willebrand y del hematocrito No es específico
RPPA (Rapid Platelet Function Analyser)	Simple Rápido Semiautomático Correlacionado con eventos clínicos	Sensibilidad y especificidad inciertas

Nota. COX1: ciclooxigenasa 1 (Lugo JJ).

Existen varias pruebas para evaluar la resistencia a la aspirina (tabla 1):

1. **Ensayos plaquetares.** Al medir la reactividad plaquetar pueden, indirectamente, cuantificar el efecto antiagregante. Pero muchos estudios determinan una agregación plaquetar que puede no ser inducida únicamente por el TXA2. Así, la prueba identificaría a un paciente como resistente aunque el efecto se dé porque la COX1 esté inhibida de modo satisfactorio por el AAS.
2. **Tiempo de hemorragia.** Da una medida indirecta del tiempo necesario para formar un trombo cuando se realiza una punción de dimensiones estandarizadas en la piel. Es la única prueba realizable *in vivo*. Cuando los vasos se lesionan, las plaquetas se adhieren al colágeno expuesto y al subendotelio vascular. El

tiempo aumenta en pacientes con plaquetopenia, en alteraciones de la función plaquetar o con la ingesta de AINE, pero no se modifica en hemofílicos (es independiente de las alteraciones de la coagulación)⁷. Su valor oscila entre los 2 y los 9 minutos, según el test utilizado (Ivy, Template, Template modificado o Duke).

3. **PFA-100 (Analizador de la Función Plaquetar PQ-100, Dade-Behring, IL, EUA)**. Usa citrato como anticoagulante y, posteriormente, la muestra pasa por un cartucho revestido con un agonista plaquetar (colágeno, ADP o epinefrina). La agregación tapona el orificio central (figura 6). Así, mide el cese del flujo sanguíneo en tiempo y valora la hemostasia primaria. Evalúa la disfunción plaquetar hereditaria, adquirida o inducida por fármacos. Es sencilla, reproducible y rápida⁴⁵, y puede ser realizada en ámbitos no hospitalarios terciarios y, aunque no valora el efecto de las piridinas, parece más sensible que la agregometría⁴¹.

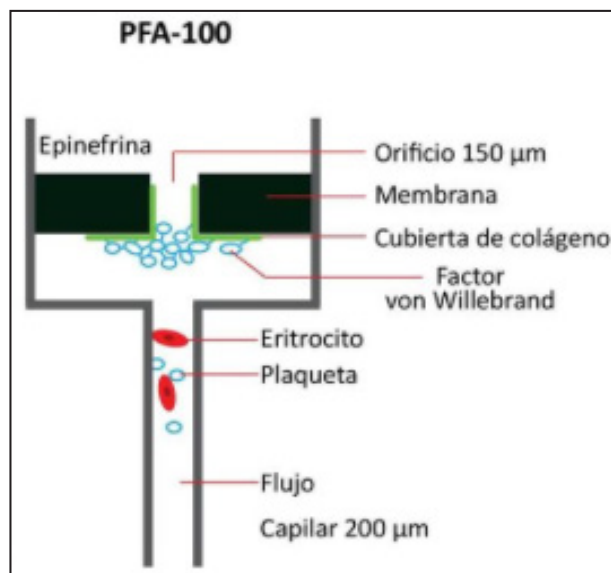


Figura 6. PFA-100: analizador de la función plaquetar PQ-100 (Campuzano-Maya G).

4. **Metabolitos de la aspirina y del TXA₂**. Los primeros no se utilizan por la gran variabilidad individual de su metabolismo. Los segundos no miden directamente la reactividad plaquetar y, además, no son específicos de las plaquetas, pues monocitos, macrófagos y células endoteliales también los producen.
5. **LTA (Agregometría por Transmisión de Luz, Accumetrics, CA, EUA)**. El agregómetro mide la densidad óptica del plasma rico en plaquetas obtenido por centrifugación, tras la inducción de la agregación plaquetar por ARA, trombina, ADP, colágeno o epinefrina. Es considerado el patrón de oro para monitorizar la función plaquetar³⁷, aunque no permite estudiar las interacciones entre eritrocitos y plaquetas al usar plasma rico en éstas. La ergometría por impedancia se basa en el mismo principio, es más simple y no requiere centrifugación.
6. **Reactividad plaquetar**. Mide la activación tras una lesión vascular estandarizada y mezcla la muestra con EDTA, donde se disuelven, o con EDTA y formaldehído, donde permanecen fijas. La centrifugación hace que las plaquetas inactivas queden flotando y se recuenta su número.
7. **Citometría de flujo**. Utiliza anticuerpos monoclonales. Ha demostrado que en pacientes que toman AAS se hallan disminuidos la trombopondina, la GPIIb/IIIa, la P-selectina, el complejo ligando-CD40 y los conglomerados de plaquetas y monocitos⁴⁶. La P-selectina mide indirectamente la agregación plaquetar inducida por ARA. Presenta resultados comparables con la ergometría en muchos estudios, aunque no en todos⁴⁷.
8. **RPFA (Rapid Platelet Function Assay, Accumetrics, CA, EUA)**. La sangre pasa por un cartucho transparente de fibrinógeno que contiene activadores

plaquetares como ARA, epinefrina o colágeno. La transmisión de luz varía de color al formarse trombos.

9. URPFA (Ultegra Rapid Platelet Function Assay, Accumetrics, CA, EUA) y tromboelastograma. Se trata de técnicas prometedoras, aunque actualmente no hay resultados concluyentes⁴⁸.

Como ya se ha mencionado, el concepto de resistencia a la aspirina surgió al comprobarse que no todos los pacientes poseían la misma protección frente a accidentes vasculares. Se ha publicado que sólo el 22 % presenta ventajas terapéuticas⁴⁹. Es más, se ha demostrado una variación significativa de la función plaquetar en poblaciones de sujetos sanos, con factores de riesgo, con enfermedad coronaria, periférica y cerebrovascular⁷. Aunque no está firmemente establecida, es muy probable que se multifactorial (tabla 2):

- 1. Dosis inadecuada.** Numerosos estudios han demostrado que 325 mg no ofrecen niveles de inhibición de la COX superiores a 81 mg pues, como ya se ha descrito, el proceso es rápido, irreversible y dosis-independiente²⁸. Dosis elevadas parecen proteger en trabajos que usan pruebas de laboratorio, pero esto no se confirma en los estudios basados en la clínica.
- 2. Incumplimiento.** El 40 % de los pacientes no cumple el tratamiento, y tiene un mayor riesgo de sufrir episodios cardiovasculares agudos recurrentes⁵⁰. De hecho, muchos estudios sugieren que es la principal causa de resistencia^{47,50,51}. No existe un patrón de oro para evaluar el cumplimiento: la confirmación verbal no es fiable, se producen incumplimientos de bata blanca (no identificables con las mediciones de los niveles plasmáticos de salicilatos, dada la vida media de la aspirina), y aparece el efecto Pigmalión al saberse observados los pacientes.

Tabla 2. Causas de resistencia

Resistencia a la aspirina	
Factores clínicos	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de adhesión al tratamiento • Falla en la absorción o interacción medicamentosa • Insuficiencia cardíaca • Liberación de catecolaminas por ejercicio y/o estrés
Factores celulares	<ul style="list-style-type: none"> • Generación de la isoforma de la PGF₂ • Trastornos en las insoenzimas COX 1 y 2 • Activación plaquetaria inducida por eritrocitos
Factores genéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Polimorfismo de los receptores GPIIb/IIIa • Polimorfismo del factor de Von Willebrand o del colágeno

Nota. COX: ciclooxigenasa (Lugo JJ).

3. Activación plaquetar no dependiente del TXA₂. Serotonina y trombina activan las plaquetas por una vía independiente de la de la COX1. Y a través de la COX2 endotelial y del músculo liso se produce TXA₂. La COX2, producida en grandes cantidades en presencia de lesión endotelial⁵², convierte el ARA en PGH₂, que puede ser transportada a las plaquetas para producir TXA₂. La COX1, además, puede regenerarse en macrófagos y células endoteliales para perpetuar la producción de TXA₂.

4. Aumento de la reactividad plaquetar. Varios factores pueden contribuir como, por ejemplo, la interacción entre eritrocitos y plaquetas, pues los primeros aumentan la producción de factores esenciales en la formación del

trombo (TXB₂, serotonina, ADP y betatromboglobulina). Los polimorfismos de la subunidad IIIa del receptor de la GPIIb/IIIa se asocian a un incremento en la formación de trombina y a una disminución del umbral de activación. Están presentes en un 20-30 % de la población europea, y podrían beneficiarse de un aumento de la dosis antes que del cambio por otro antiagregante, al igual que los pacientes con polimorfismos de COX1, COX2 y TXA₂⁵³. La elevación de PGF₂ alfa aumenta la respuesta plaquetar y produce vasoconstricción. Y, por último, un aumento de la sensibilidad de las plaquetas al colágeno, un agonista plaquetar, la elevación del FvW, noradrenalina, lipidemia y ADP producen un aumento de la reactividad. El uso de otra terapia antiagregante concomitante y las medidas higienicodietéticas se erigirían en baluartes del tratamiento^{54,55}.

5. Aumento del recambio plaquetar. Ocurre como respuesta a arteriosclerosis activa, y en hemorragias y cirugías⁵⁶. Los pacientes que recibieron AAS diario tras una derivación coronaria mostraron una inhibición de la síntesis de TX del 30-50 %, porcentaje notablemente inferior al 94 % que presentaron los voluntarios sanos. El aumento de la renovación plaquetar podría generar un aumento de la fracción de plaquetas capaces de formar TX entre los intervalos de las dosis. También en este caso parece que existiría un mayor beneficio al aumentar la dosis de antiagregación o al incrementar las dosis⁴⁰.

6. Rutas alternativas en la producción de TXA₂. La enzima está presente no sólo en monocitos, megacariocitos y macrófagos, sino también en las plaquetas inmaduras⁵⁷. Por ello, el TXA₂ se encuentra elevado en procesos en los que estas células están presentes en grandes cantidades: accidentes aterotrombóticos o IAM. Por otro lado, se han publicado mutaciones genéticas que reducen su afinidad por la aspirina⁵⁸. Los pacientes con una COX1 regenerada pueden

presentar una mayor activación en sus megacariocitos con la toma prolongada de AAS (taquifilaxia)⁵⁹. La COX2 no suele hallarse en las plaquetas, pero puede aparecer tras su activación por factores de crecimiento y mediadores de la inflamación, especialmente en la placa ateromatosa. Así, el TXA2 sintetizado por la COX2 puede ser causa de resistencia plaquetar. Pueden también adquirir PGH2, precursora de los TX, a través de monocitos y macrófagos³⁷.

7. Variaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas. La absorción se produce en el estómago y en el intestino delgado proximal y está influida por el pH, de modo que la medicación antiácida acelera la absorción y la comida la retrasa. El AAS es destruido por enterasas intestinales, eritrocitos, hidrolasas y hepatocitos⁶⁰. Además, ya se ha mencionado que varios fármacos aumentan su concentración plasmática al competir por los mismos receptores. Los AINE son un caso particular, pues producen, a diferencia del AAS, una inhibición reversible de la COX1, lo que explica su efecto a corto plazo. Bilirrubina y ácido úrico provocan el mismo fenómeno. Los inhibidores selectivos de la COX2, sin embargo, no plantean este problema⁶¹. El pH urinario ácido también eleva los niveles de AAS, al enlentecer la eliminación de los metabolitos³⁷.

8. Tabaco. Como ya se ha mencionado, algunos estudios sugieren que produce resistencia debido a sus propiedades procoagulantes. Por otro lado, favorece el recambio plaquetar.

9. Tiempo. Helgason *et al.* publicaron un estudio en el que se demostró que algunos pacientes pasaban de una respuesta completa de inhibición a otra parcial tras seis meses de terapia⁴². Andersen *et al.* cifraron en un 10 % el porcentaje de pacientes resistentes tras cinco meses de tratamiento⁶². Se ha confirmado

una pérdida de la eficacia en terapias prolongadas, especialmente mayores de 500 días. Incluso a niveles diarios se ha demostrado que el efecto es mayor a las dos horas de su administración que a las 12 y a las 24 horas⁴³. Por todo ello, es altamente recomendable un control periódico durante varios meses para comprobar su eficacia.

10. Catecolaminas. El estrés y el ejercicio aumentan sus niveles y conducen a un estado protrombótico. La agregación plaquetar catecolaminérgica no se inhibe con AAS, lo que también ocurre con la actividad deportiva. En ambos casos, la serotonina, el aumento del gasto cardíaco y los cambios del flujo sanguíneo pueden generar un estado protrombótico de las catecolaminas, con lo que beneficios incuestionables quedarían en entredicho y darían paso a unas líneas de investigación inéditas⁶³.

11. Falta de consenso en su definición. Las prevalencias varían notablemente según la técnica aplicada: 1-56 % (PFA-100), 7-27 % (RPFA) y 0,4-70 % (LTA). Independientemente de la prueba de laboratorio utilizada, parece evidente que el efecto del AAS varía en función del individuo, e incluso en el mismo individuo en función del tiempo³⁷.

3.5. Polimorfismos y resistencia

Aunque ya se han mencionado anteriormente, merecen una consideración especial. La membrana plaquetar contiene receptores transmembrana glucoproteicos, altamente polimórficos y codificados por dos o más isoformas alélicas. Los polimorfismos de un solo nucleótido (PSN)

son contribuyentes importantes de la reactividad plaquetar residual en pacientes con resistencia a la aspirina, de modo que pueden alterar su estructura y modificar así su función biológica. Diversos estudios han publicado que un 30 % de la reactividad plaquetar es debido a factores hereditarios⁶⁴.

1. **GPIIb/IIIa**. Como ya se ha citado, los polimorfismos de esta integrina se relacionan con un aumento del riesgo de trombosis. El PSN rs5918, consistente en una mutación de leucina por prolina en el aminoácido 33, se ha relacionado no sólo con enfermedad cardiovascular, sino también con la ruptura de la placa ateromatosa e ictus isquémico⁶⁵.
2. **GPIa/IIa y GPVI**. Se trata de los receptores del colágeno más importantes y se han relacionado con la atenuación del efecto antiagregante de la aspirina. Aunque varios polimorfismos se asocian a la resistencia, algunos trabajos presentan resultados opuestos. Sokol *et al.* encontraron una relación entre rs1671153 y agregación plaquetar en situaciones de aborto espontáneo⁶⁶.
3. **FvW**. Producido por endotelio y megacariocitos y transportador del FVIII, media la adhesión de las plaquetas al endotelio lesionado. EL PSN rs1063856 se ha asociado a una actividad procoagulante en una población española a través del tPA, y a un aumento del riesgo de TV⁶⁷. Sin embargo, la evidencia mas importante fue la que relacionó, en un metaanálisis, el PSN rs6065 e ictus isquémico⁶⁸.
4. **COX2**. Aparece elevada en ambientes de estrés oxidativo e inflamación, aunque raramente se halla en condiciones fisiológicas en la mayoría de las células⁶⁹. Sus polimorfismos se han asociado a trombosis e inflamación.

5. **P2Y1 y P2Y12.** Pertenecen a la familia de los receptores acoplados a GP, y sus polimorfismos se han podido relacionar con una reactividad plaquetar residual⁷⁰.
6. **Receptor del TXA2.** Se ha sugerido su implicación en procesos como isquemia cerebral y agregación plaquetar⁷¹.

A pesar de todos estos trabajos, sin embargo, sólo se ha podido demostrar una evidencia 2B (moderada) en la relación de los PSN rs6065 y rs10306114 con la resistencia a la aspirina.

3.6. Inflamación y resistencia

La inflamación es una compleja reacción biológica de los tejidos vascularizados a estímulos patológicos en la que aparecen células inmunes, vasos y mediadores. Tiene un papel predominante en la trombosis y en todas las fases de la arteriosclerosis al promover la ruptura de la placa³⁰. Las plaquetas pueden ser factores amplificadores de los procesos inflamatorios al liberar mediadores e inducir la expresión de los receptores de esos mediadores en monocitos y granulocitos. Por otra parte, estudios recientes sugieren que las plaquetas desencadenan la formación del trombo al iniciar la respuesta inflamatoria, la cual reduce el efecto de la aspirina⁷². La disfunción endotelial en pacientes con inflamación o estrés oxidativo se asocia a la supresión de PGI₂ y ON, lo que contribuye a la resistencia a la aspirina⁷³. Las plaquetas, aun siendo anucleadas, pueden sintetizar de forma muy limitada proteínas *de novo*, ya que poseen residuos ribosomales y de ARNm, por lo que podrían regenerar COX1 *de novo* en respuesta a determinados estímulos. Así, la aspirina a dosis bajas no suprime de modo persistente la síntesis de TXA₂⁷⁴.

3.7. Resistencia en el síndrome metabólico

Se trata de una alteración del uso y almacenamiento de energía, y se asocia a obesidad, dislipemia, hiperglucemia e hipertensión. Se considera un factor de riesgo independiente y predictor de enfermedad vascular. Entre sus complicaciones destacan inflamación y disfunción endotelial⁷⁵. La diabetes *mellitus* aumenta el estrés oxidativo y la formación de micropartículas plaquetares, por lo que éstas forman agregados más fácilmente, lo cual favorece un estado protrombótico. La aspirina presenta menos eficacia en la prevención primaria de enfermedad aterotrombótica en estos pacientes. Además, existe una activación plaquetar persistente y se ha publicado un aumento de la resistencia a la aspirina en pacientes diabéticos⁷⁶.

La homocisteína se asocia a trombosis, ictus y cardiopatía isquémica, por lo que contribuye a la resistencia. Se ha sugerido que puede ser factor de riesgo en la resistencia y que podría actuar como sensibilizador específico de las plaquetas⁷⁷.

Finalmente, la obesidad central presenta una amplia variedad de disfunciones en la adhesión, agregación y sensibilidad plaquetares, hechos que se suman a la elevada concentración de factores protrombóticos (fibrinógeno, FvW y FVIII) y al aumento en la actividad de los monocitos⁷⁸.

3.8. Impacto clínico y terapéutico de la resistencia

Existen evidencias de que los pacientes resistentes según pruebas de laboratorio presentan un mayor riesgo de tromboembolias. En un estudio prospectivo, durante dos años de

seguimiento a 326 pacientes que tomaban 325 mg diarios de aspirina, 17 (5,2 %), que fueron definidos como resistentes mediante la agregometría, presentaron un mayor riesgo relativo de muerte, IAM o accidente cerebrovascular respecto a pacientes sensibles (24 % vs. 10 %)⁷⁹. A pesar de la contundencia que arrojan estos resultados, hay que decir que la agregometría presenta sus propias limitaciones y que se trataba de una muestra pequeña, lo que se reflejó en un amplio intervalo de confianza.

El 60% de los pacientes con enfermedad arterial periférica que fue sometido a angioplastia presentó resistencia y un riesgo aumentado (87 %) de padecer una reoclusión arterial durante los dos años siguientes. En el grupo de pacientes sensibles no se objetivó ninguna reobstrucción⁸⁰.

En otro estudio, esta vez de casos y controles, se hallaron concentraciones urinarias elevadas de metabolitos de TXA2 en pacientes que sufrieron accidentes vasculares. Es más, los pacientes situados en el cuarto con valores más elevados (lo que sugería un fracaso importante de la aspirina para reducir la producción de TX), duplicaban el riesgo de IAM, y multiplicaban por 3,5 el de muerte por causa cardiovascular⁴⁰.

Por otro lado, se han publicado trabajos en donde no se aprecian diferencias significativas en los resultados clínicos obtenidos. Como muestra, Butchanan *et al.* no pudieron demostrar un riesgo mayor de accidentes trombóticos en los no respondedores⁸¹, y Andersen *et al.* sólo hallaron una tendencia ascendente en estos tras cuatro años de seguimiento⁶².

Hoy en día una de las cuestiones a plantear más importantes es si el hallazgo de resistencia según las pruebas de laboratorio implica fallo clínico. La resistencia se ha asociado al sexo

masculino y afectación renal, y presenta un riesgo aumentado de muerte, síndromes coronarios agudos, fallo del tratamiento quirúrgico y nuevos episodios cerebrovasculares⁸². En ese mismo estudio, además, la resistencia afectaba negativamente al pronóstico y el riesgo aumentado no se reducía con tratamientos antiplaquetares concomitantes. En la misma dirección, en otro metaanálisis, la *odds ratio* de padecer efectos clínicos en pacientes resistentes sin cirugía intervencionista fue de 4,37, y de 3,78 en pacientes sometidos a dicho tratamiento tras un primer episodio cardiovascular⁸³.

El 16 % de los pacientes sometidos a endarterectomía carotídea con tratamiento diario de 100 mg de aspirina resultó ser resistente aplicando el PFA-100 y, sin embargo, la citometría de flujo presentó a todos los pacientes como sensibles⁴⁷. Por otro lado, más de la mitad de los pacientes que se sometieron a la misma cirugía con 150 mg de AAS previos durante dos semanas tenía una reactividad plaquetar intraoperatoria elevada. Este fenómeno, determinado con agregometría con ARA, revertía espontáneamente poco después de la cirugía⁸⁴. En la misma línea, existe un aumento de la reactividad plaquetar en las primeras cuatro horas del postoperatorio de una angioplastia de extremidades inferiores que no es debida al aumento de ADP, trombina o epinefrina. Esto podría justificar el aumento del riesgo de afectación cardíaca perioperatorio en pacientes sometidos a cirugía vascular⁸⁵.

Si bien Mueller *et al.* hallaron un 60 % de pacientes resistentes usando la LTA, y hasta un 8 % de reoclusiones en 100 pacientes claudicantes sometidos a angioplastia percutánea y en tratamiento con 100 mg de AAS durante 18 meses, Ziegler *et al.*, en un estudio de poca potencia estadística, publicaron un 9,6 % de resistencias usando el PFA-100 en los pacientes sometido un año antes a angioplastia y antiagregados. Curiosamente, no se correlacionó con reoclusión en el caso de los que tomaron AAS, todo lo contrario de lo que sucedió con los resistentes a clopidogrel⁸⁶.

3.9. Manejo de la resistencia

Una leve mejora en la eficacia del tratamiento, dados el alcance de la enfermedad cardiovascular y el uso tan extendido de la aspirina, conllevaría un gran impacto en la morbimortalidad y en la prevención de accidentes vasculares a nivel mundial. A la hora de encarar la resistencia a la aspirina existe una problemática multifactorial:

1. La evaluación rutinaria con pruebas de laboratorio de la respuesta plaquetar no está justificada en todos los pacientes⁸⁷.
2. Hay una falta de consenso a la hora de definir con exactitud la resistencia a la aspirina. Es incorrecto considerar a todos los pacientes con clínica aterotrombótica siguiendo una terapia antiagregante, resistentes. Sería más correcto hablar de fracaso terapéutico⁸⁸.
3. Los estudios realizados utilizan diferentes técnicas de laboratorio cuyos resultados no se correlacionan entre ellos. Muchos estudios han usado test inespecíficos que identifican a pacientes con aumento de reactividad plaquetar residual, lo cual no es necesariamente debido a los antiagregantes. Hace falta una prueba rápida, sencilla, asequible, fácilmente interpretable y con mayores valores predictivos⁸⁹.
4. Muchos trabajos no poseen una potencia estadística adecuada para extraer conclusiones contundentes debido, por ejemplo, a un tamaño muestral pequeño o a una valoración inadecuada de factores confusionales.
5. Los mecanismos biológicos son multifactoriales y no totalmente conocidos.

6. La existencia de la problemática descrita dificulta notablemente la instauración de pautas a seguir.

Por todo ello, actualmente la mejor opción para combatir la resistencia se basa en el control de todos aquellos factores modificables, como el exacto cumplimiento del tratamiento, las interacciones farmacológicas, las comorbilidades, la abstinencia de tabaco y el uso de dosis mayores de AAS (325 mg) durante un accidente coronario agudo y tras procesos terapéuticos de revascularización. Si, a pesar de estas medidas aparece clínica, hay que considerar tratamientos alternativos para sustituir o complementar al AAS²⁷:

1. Piridinas (ticlopidina, clopidogrel). Son antagonistas de los receptores de ADP. Las plaquetas resistentes al AAS han demostrado ser más sensibles al ADP⁹⁰.
2. Inhibidores de la fosfodiesterasa (dipiridamol).
3. Inhibidores de las últimas fases de la agregación (abuximad, tirofiban, eptifibatida).

En aquellos pacientes de alto riesgo con resistencia documentada, y tras corrección de los factores anteriormente descritos, la opción siguiente podría ser el uso de clopidogrel, que ha demostrado ser tan efectivo como la aspirina en enfermedades coronarias y cerebrovasculares, ya que es más eficaz la combinación de antiagregantes que el uso únicamente del AAS en estos casos⁹¹. El clopidogrel consiguió una reducción del 7-8 % del riesgo relativo de ictus recurrente, IAM o muerte por accidente vascular comparado con la aspirina, y de un 20 % si se tomada combinado con aspirina, en comparación con la toma solamente de ésta. A pesar de que el riesgo de hemorragia aumentó con la doble antiagregación (3,7 % vs. 2,7 %), no hubo diferencias significativas en la mortalidad por ella⁹². Por su lado, la ticlopidina ha demostrado

reducir la tasa de recurrencia de accidentes isquémicos transitorios en los pacientes en los que la aspirina no fue efectiva⁹³.

4. HIPÓTESIS

La resistencia plaquetar a la aspirina es un problema clínico que conlleva un mayor riesgo de sufrir un evento trombótico agudo que las personas con plaquetas sensibles. Se han postulado diferentes mecanismos para intentar explicar la existencia de una mala respuesta antitrombótica a la aspirina.

Uno de los factores que se ha intentado relacionar con la resistencia de las plaquetas a la aspirina es la posible heterogeneidad de las plaquetas en estos individuos. Además, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que las plaquetas resistentes expresan proteínas constitutivas relacionadas con el metabolismo energético, el estrés oxidativo y el citoesqueleto plaquetario de forma diferente que las plaquetas sensibles a la aspirina. Como las plaquetas son células anucleadas con una capacidad muy reducida para sintetizar proteínas *de novo*, estas diferencias en el contenido proteico entre plaquetas sensibles y resistentes a la aspirina puede producirse desde la generación de las plaquetas diferentes por los megacariocitos.

5. OBJETIVOS

1. Determinar si megacariocitos estimulados para producir plaquetas generan plaquetas diferentes en presencia o ausencia de aspirina, en términos de expresión y capacidad de generar moléculas asociadas a los mecanismos de estimulación e inhibición plaquetarios (TXA₂), y de la síntesis de ON y de proteínas relacionadas con el estado oxidativo.

2. Evaluar si con la presencia de aspirina los megacariocitos generan plaquetas diferentes en relación con mecanismos proapoptóticos.

3. Analizar en plaquetas resistentes y sensibles a la aspirina si existen diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis.

4. Establecer en una situación experimental de estimulación de la actividad plaquetaria si las plaquetas sensibles o resistentes a la aspirina pueden tener una activación diferente de la respuesta apoptótica.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos *in vitro* de plaquetas se realizaron utilizando las células Meg-01 (Sigma-Aldrich, MO, EUA), pertenecientes a una línea celular de leucemia megacarioblástica humana usada de modo generalizado como modelo de megacariocitos humanos. Por ello, los términos células Meg-01 y megacariocitos se consideran sinónimos en el texto.

En respuesta a diversos estímulos, las células Meg-01 dan lugar a plaquetas que son definidas como partículas *platelet-like* (PPL)⁹⁴. Éstas, generadas a partir de células Meg-01 estimuladas, han demostrado compartir similitudes con plaquetas humanas^{95,96}. 6 cultivos diferentes de células Meg-01 crecieron en un medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) con suplemento de suero bovino fetal al 10 %, L-glutamina (5 mmol/l), antibiótico y CO₂ atmosférico al 5 % a 37 °C. Antes de comenzar el trabajo, las células Meg-01 fueron sincronizadas con suero bovino fetal ascendente al 5 % durante 24 horas. Para estimular la maduración de los megacariocitos para formar PPL, las células Meg-01 fueron incubadas en 10 nmol/l de forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) durante 72 horas. En algunas muestras se añadió AAS a 0,33 mmol/l. Su concentración fue similar a la encontrada en el plasma de pacientes que lo tomaban a bajas dosis⁹⁷.

72 horas después de añadirse PMA las preparaciones se centrifugaron a 900 r. p. m. durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron centrifugados de nuevo a 2000 r. p. m. el mismo tiempo. Como en publicaciones previas^{98,99}, con el análisis de citometría de flujo las PPL fueron etiquetadas positivamente por el marcador plaquetar CD61 y se mostraron más pequeñas que las células Meg-01 (figura 7). Considerando el tamaño, la pureza de las PPL oscilaba alrededor de un 92 %, cifra similar a las obtenidas en otros estudios⁹⁹.

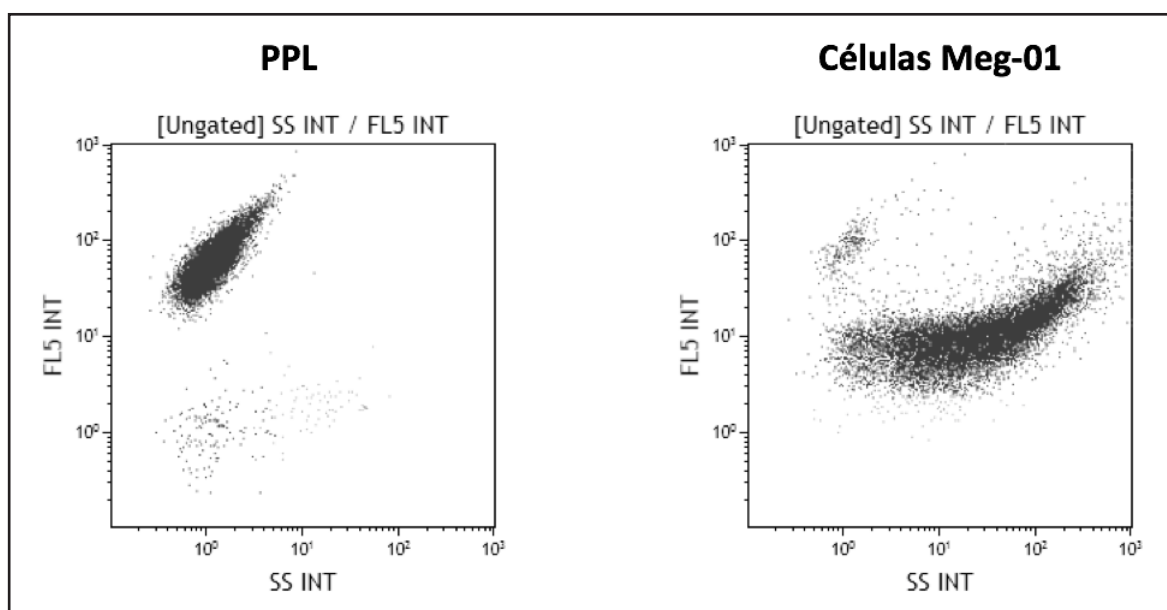


Figura 7. Citometría de flujo para identificar la presencia de partículas *platelet-like* (PPL) en las muestras. A la izquierda se aprecia la muestra de PPL y, a la derecha, la de megacariocitos.

6.1. Expresión proteica

Al igual que en otros trabajos, el nivel de expresión de diferentes proteínas fue evaluado mediante la técnica de Western blot. Para ello, 20 μg de proteínas totales de PPL, estimados mediante un reactivo de ácido bicinonítico (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) fueron desarrollados en SDS/PAGE al 15 %¹⁰⁰. Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con anticuerpos monoclonales contra ON sintasa 3 (ONS3) (dilución 1/1500; sc-653, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) y Bak (dilución 1/1000; Y164, Abcam, RU) y anticuerpos policlonales contra el receptor de TXA2 (dilución 1/1500; sc-18377, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), Bax (dilución 1/500; PC66, Oncogene Research Products, CA, EUA), Mn-superóxido (SO) dismutasa (SOD) mitocondrial (dilución 1/1000; sc-30080, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) y la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa (dilución 1/1000; sc-5827, Santa Cruz

Biotechnology, CA, EUA). Un anticuerpo monoclonal antibetaactina (dilución 1/7500; A-5441, Sigma-Aldrich, MO, EUA) se utilizó como control para la carga proteica. En este punto, las membranas de nitrocelulosa fueron reveladas con Ig G contra la peroxidasa conjugada de conejo (con diluciones 1/2500 para ONS3, 1/2000 para SOD, 1/500 para Bax), Ig G contra la peroxidasa conjugada caprina (dilución 1/2000 para gp91-phox, Bak y el receptor de TXA2) e Ig G contra la peroxidasa conjugada de ratón (dilución 1/7500 para betaactina). La señal proteica se obtuvo con reactivos quimioluminiscentes (ECL, GE Healthcare, RU) que fueron sometidos a análisis densitométricos utilizando un transiluminador (Gel Logic 440 Imaging System, Kodak, NY, EUA).

6.2. Medición de nitrito + nitrato y TXA2

La liberación de nitritos y nitratos (como estimación indirecta de ON) de las PPL y el TXB2 contenido en ellas (el TXB2 es el principal metabolito del TXA2) fueron medidos en PPL mantenidas durante 20 minutos en continuo movimiento (a 1000 r. p. m.) a 37 °C. Tras la incubación, fueron centrifugadas a 2500 r. p. m., a 4 °C, y residuos y sobrenadante fueron almacenados a -80 °C hasta que se determinaron los parámetros.

La medición de nitrito + nitrato en las PPL sobrenadantes se obtuvo utilizando un equipo de ensayo colorimétrico (78001, Cayman Chemical Company, MI, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los coeficientes de variación inter- e intraensayo fueron, respectivamente, 2,7 % y 3,7 %.

El contenido de TXB2 en las PPL fue determinado con un equipo enzimático comercial (Amersham Biosciences, Suecia). Las variaciones inter- e intraensayo fueron, a su vez, 11,9 % y 5,6 %.

6.3. Actividad de la caspasa-3

Para su medición se usaron 250 μ g de proteína plaquetar por muestra. Su actividad se determinó con un equipo comercial colorimétrico (dilución 1/1000; ab39401, Abcam, RU). Éste se basó en la detección del cromóforo p-nitroanilina, siguiendo las instrucciones del fabricante y, tal como especificaba, la actividad de la caspasa-3 se expresó en unidades de densidad óptica (DO) a 405 nm.

6.4. Determinación de la liberación de citocromo c al citosol

Debido al relativamente bajo nivel del citocromo c citosólico en las plaquetas no se podía utilizar la técnica de Western blot para su identificación. Por ello, se usó un análisis Dot blot: los extractos citosólicos plaquetares se obtuvieron con un equipo comercial (Catalog # 8987, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), el cual permite una separación de mitocondria y citosol.

De modo similar a otros trabajos publicados, el análisis Dot blot se consiguió al cargar 2,5 μ g de proteínas citosólicas totales en membranas de nitrocelulosa^{100,101}, las cuales fueron posteriormente bloqueadas con albúmina de suero bovino al 5% p/v y, tras lavado, fueron

incubadas con un anticuerpo policlonal anticitocromo c (dilución 1/1000; ab90529, Abcam, RU). Las membranas fueron incubadas tras ello con Ig G anti peroxidasa conjugada de ratón y desarrolladas mediante quimioluminiscencia.

6.5. Pacientes con plaquetas sensibles y resistentes al AAS

24 pacientes caucásicos con isquemia coronaria clínicamente estable que tomaban AAS fueron incluidos en el estudio. Se dividieron en dos grupos, resistentes (n = 11) y sensibles (n = 13), según la funcionalidad de las plaquetas demostrada por el PFA-100¹⁰². Dicha prueba ha sido ampliamente utilizada para determinar la respuesta plaquetar al AAS¹⁰²⁻¹⁰⁴, y ya se ha comentado anteriormente que varios trabajos han concluido que pacientes con plaquetas resistentes al AAS tienen un mayor riesgo de accidentes cardiovasculares que aquellos que poseen plaquetas sensibles¹⁰⁵.

Los pacientes incluidos en el estudio tomaron 100 mg de AAS cada 24 horas durante, como mínimo, los nueve meses previos. Por otra parte, los criterios de exclusión fueron:

1. Aparición de un accidente cardiovascular agudo durante los nueve meses anteriores a la inclusión.
2. Terapia antitrombótica distinta al AAS.
3. Ingesta de AINE en los 30 días previos.
4. Tratamiento con nitratos.

5. Cáncer o enfermedad inflamatoria.

6. Trombocitopenia, anemia o creatinina plasmática superior a 2 mg/dl.

Para las pruebas del PFA-100 se utilizaron cartuchos con membranas cubiertas de colágeno con epinefrina infundida. El tiempo necesario para la oclusión de una pequeña apertura (150 μ m) realizada en la membrana se define como el tiempo de cierre (TC) y es indicativo de la función plaquetar de toda la muestra sanguínea. Siguiendo estudios previos¹⁰², y en consonancia con el fabricante, los valores comprendidos entre 93 y 193 identificaron a los pacientes con resistencia al AAS. Los pacientes sensibles presentan cifras superiores.

En línea con otras publicaciones¹⁰²⁻¹⁰⁴, sólo los pacientes con un rango similar de TC en la inclusión y una hora después de la toma de 100 mg adicionales de AAS fueron incluidos en el estudio.

Las muestras sanguíneas se colocaron en tubos con un 10 % p/v ACD obtenidas tras una venopunción antecubital realizada por la mañana, 2-4 horas tras la toma de AAS. Los primeros 3-4 ml se desecharon para disminuir la activación plaquetar espontánea. El estudio se realizó siguiendo fielmente la Declaración de Helsinki, y el Comité Ético local aprobó su ejecución (C. I. 12/163-E). Finalmente, todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

6.6. Análisis estadístico

Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media. Para comparar las variables entre los grupos se utilizó la U de Mann-Whitney. Se realizó un análisis lineal de

regresión para determinar si en los experimentos con las plaquetas obtenidas la edad podía ser un factor de confusión. Las variables dependientes fueron la expresión de Bax y Bak, la actividad de la caspasa-3 y los niveles citosólicos de citocromo c. La respuesta plaquetar al AAS se consideró una variable independiente y la edad se utilizó como covariante. El análisis estadístico se elaboró mediante *software* SPSS 22.0. Por último, se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Contenido y receptores de TXA2 y expresión de ONS3 en plaquetas neoformadas

El contenido de TXA2 en PPL no fue diferente en las PPL neoformadas a partir de las células Meg-01 estimuladas en presencia de AAS en comparación con las incubadas en su ausencia. El nivel de expresión del receptor de TXA2 fue similar en ambos grupos (figura 8).

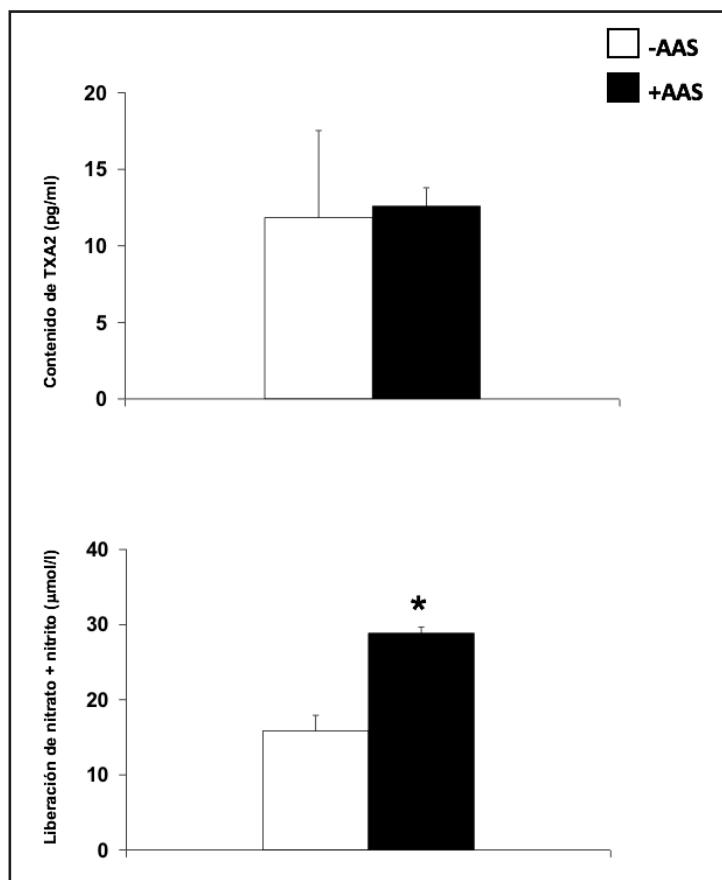


Figura 8. Contenido de tromboxano A2 (TXA2) y liberación de óxido nítrico medido como nitrato + nitrito por las partículas *platelet-like* obtenidas de megacariocitos incubados en presencia o ausencia de ácido acetilsalicílico (AAS).

Sin embargo, PPL formadas *de novo* a partir de células Meg-01 expuestas al AAS mostraron una mayor expresión significativa de proteína ONS3 que las PPL derivadas de células Meg-01 no expuestas (figura 9). Ello se acompañó, a su vez, de un contenido mayor de nitrito + nitrato en el sobrenadante de las PPL formadas a partir de células Meg-01 incubadas en AAS.

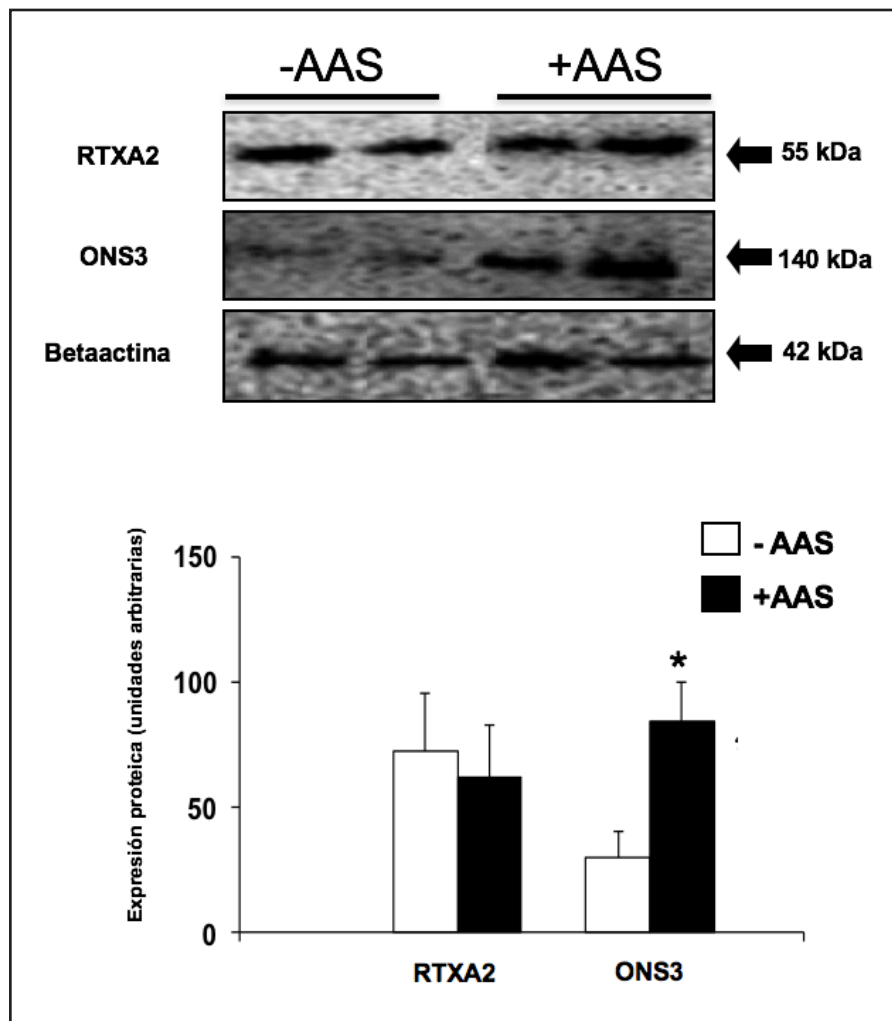


Figura 9. Expresión del receptor del tromboxano A2 (RTXA2) y de óxido nítrico sintasa 3 (ONS3) en partículas *platelet-like* obtenidas de megacariocitos expuestos y no expuestos al ácido acetilsalicílico (AAS).

7.2. Expresión del estrés oxidativo y de proteínas proapoptóticas asociadas en las plaquetas neoformadas

Los test de Western blot revelaron que las nuevas PPL generadas a partir de células Meg-01 incubadas en ausencia de AAS poseían una concentración superior de gp91-phox NADPH oxidasa y menor expresión de SOD mitocondrial que las PPL derivadas de células Meg-01 incubadas con AAS. Éstas a su vez evidenciaron un contenido superior de proteínas apoptóticas como Bax y Bak que las PPL formadas a partir de células Meg-01 no expuestas al AAS (figura 10).

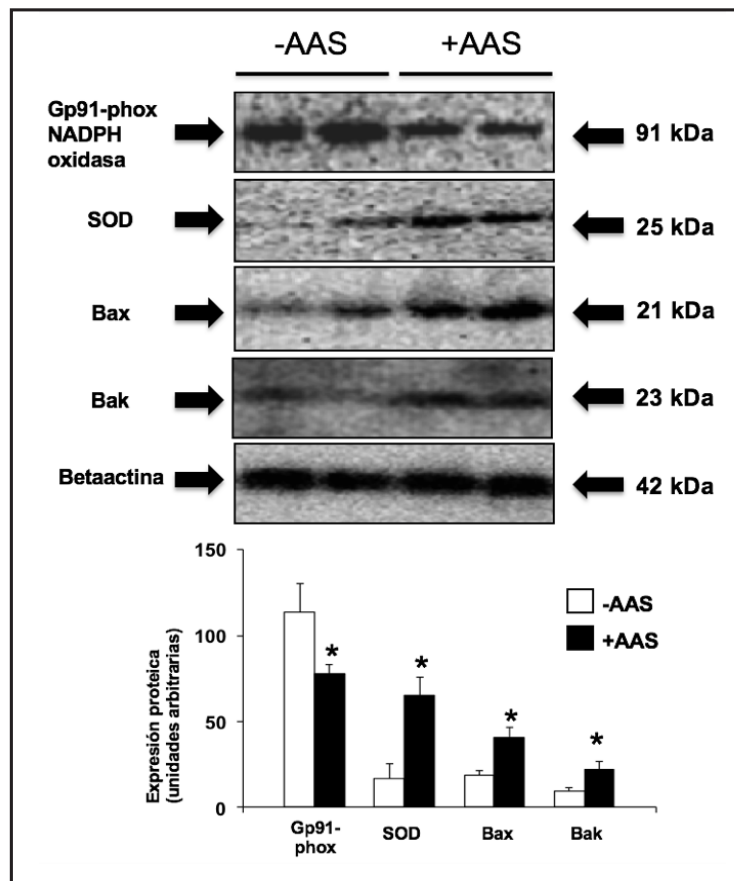


Figura 10. Expresión de superóxido dismutasa (SOD), Bax, Bak y gp91-phox NADPH oxidasa en partículas *platelet-like* obtenidas de megacariocitos expuestos y no expuestos al ácido acetilsalicílico (AAS).

Por otra parte, la actividad de la caspasa-3 fue similar en ambos grupos (en DO a 405 nm: -AAS: $0,17 \pm 0,04$, +AAS: $0,17 \pm 0,0$; p NS). Es más, en las PPL formadas *de novo* los niveles de citocromo c fueron prácticamente indetectables en el citosol plaquetar independientemente de su origen (figura 11).

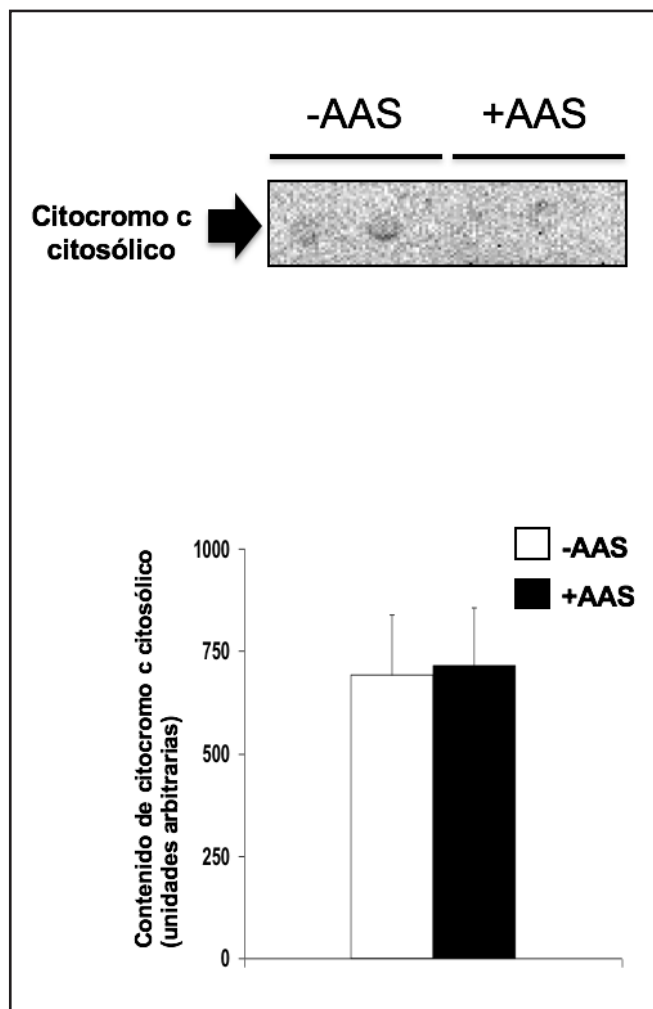


Figura 11. Liberación de citocromo c en el citosol en partículas *platelet-like* obtenidas de megacariocitos expuestos y no expuestos al ácido acetilsalicílico (AAS).

7.3. Proteínas proapoptóticas en plaquetas sensibles y resistentes al AAS

Como ya se ha comentado en el apartado Material y Métodos, se seleccionó a un grupo de pacientes con isquemia coronaria estable tratada con 100 mg de AAS durante al menos los anteriores nueve meses. Sus plaquetas se clasificaron mediante pruebas con el PFA-100 como sensibles (n = 13) o resistentes (n = 11). Las plaquetas sensibles mostraron una prolongación significativa del TC respecto a las resistentes. Las características clínicas y los tratamientos farmacológicos de ambos grupos se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes de los que se obtuvieron plaquetas sensibles y resistentes al ácido acetilsalicílico (AAS)

PARÁMETROS CLÍNICOS	<i>Sensibles (n = 13)</i>	<i>Resistentes (n = 11)</i>
Edad (años)	70.7 ± 1.9	77.5 ± 1.2*
Género (masculino/femenino)	13/0	10/1
Valores del TC (s)	294,38 ± 6,01	116.33 ± 9.57*
Hipertensión n (%)	7 (53.9)	4 (36.4)
Hiperlipemia n (%)	9 (69.2)	7 (63.6)
Diabetes <i>mellitus</i> n (%)	6 (46.2)	6 (54.5)
TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO		
Aspirina n (%)	13 (100)	11 (100)
Betabloqueantes n (%)	11 (84.6)	8 (72.7)
Inhibidores de la ECA n (%)	7 (53.9)	5 (45.5)
Estatinas n (%)	13 (100)	11 (100)

Nota. Los resultados se hallan expresados como media ± error estándar de la media (unidades). * p < 0,05 respecto a los pacientes sensibles al AAS. TC: tiempo de cierre.

La edad fue ligeramente mayor en los pacientes con plaquetas resistentes al AAS. Sin embargo, no se hallaron diferencias en los parámetros restantes que comparaban ambos grupos.

Aparentemente, las plaquetas sensibles evidenciaron un contenido superior de la proteína Bax que las resistentes. Sin embargo, cuando los valores fueron ajustados según la edad la significación estadística desapareció. El contenido de la proteína Bak, otra proteína apoptótica, fue también mayor en las plaquetas sensibles, pero a diferencia de la proteína Bax, en este caso la significación estadística se mantuvo tras ajustar la edad (figura 12).

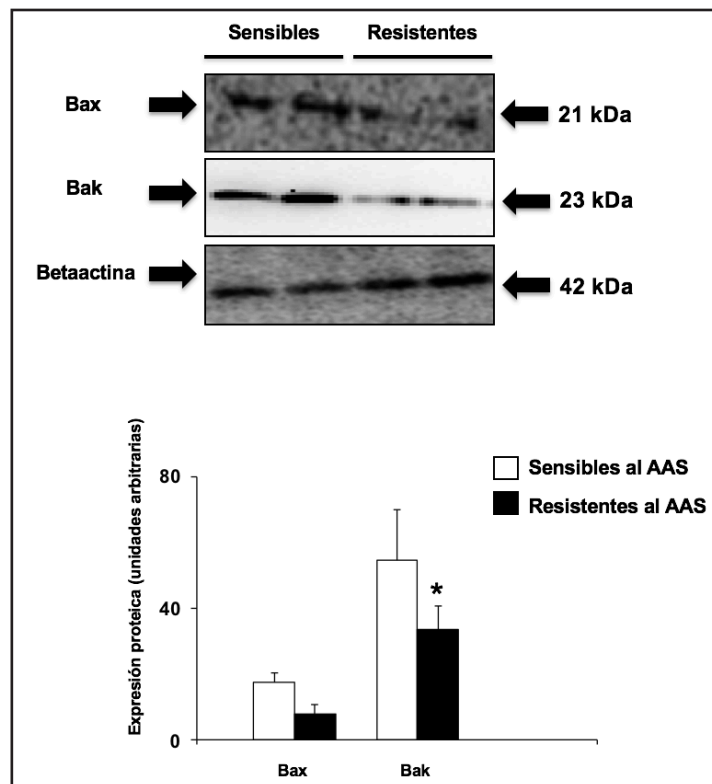


Figura 12. Expresión de proteínas proapoptóticas en plaquetas sensibles y resistentes al ácido acetilsalicílico (AAS).

La actividad de la caspasa-3 fue similar en ambos grupos (en DO a 405 nm: sensibles al AAS: $0,12 \pm 0,02$, resistentes al AAS: $0,13 \pm 0,02$; p NS) y no se modificó tras ajustar la edad.

A la luz de estos resultados paradójicos que demostraban que en las plaquetas sensibles la mayor expresión de proteínas proapoptóticas no se acompañaba de cambios en la actividad de la caspasa-3, se pensó en la posibilidad de que el estado apoptótico pueda ocurrir bajo condiciones de apoptosis plaquetar facilitada. Por ello, un subgrupo de plaquetas obtenidas por nuevos pacientes sensibles (n = 8) y resistentes (n = 6) fue seleccionado y sus PPL incubadas durante 60 minutos con ionóforo de calcio (A23187) (10µmol/l) a una temperatura de 37 °C y en movimiento continuo a 1000 r. p. m. (tabla 4). Sólo se halló una diferencia significativa en la edad si exceptuamos el TC, obviamente superior en los pacientes sensibles.

Tabla 4. Características de los pacientes con plaquetas sensibles y resistentes al ácido acetilsalicílico (AAS) usadas en experimentos realizados con ionóforo de calcio

PARÁMETROS CLÍNICOS	<i>Sensibles (n = 8)</i>	<i>Resistentes (n = 6)</i>
Edad (años)	64.5 ± 4.5	72.8 ± 5.1*
Género (masculino/femenino)	8/0	5/1
Valores del TC (s)	300.00 ± 0.00	125.80 ± 7.97*
Hipertensión n (%)	5 (62.5)	3(50.0)
Hiperlipemia n (%)	6 (75.0)	5 (83.3)
Diabetes <i>mellitus</i> n (%)	6 (75.0)	6 (100)
TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO		
Aspirina n (%)	8 (100)	6 (100)
Betabloqueantes n (%)	7 (87.5)	5 (83.3)
Inhibidores de la ECA n (%)	5 (62.5)	5 (83.3)
Estatinas n (%)	8 (100)	6 (100)

Nota. Los resultados se hallan expresados como media ± error estándar de la media (unidades). * p < 0,05 respecto a los pacientes sensibles al AAS. TC: tiempo de cierre.

La estimulación con ionóforo de calcio incrementó la actividad de la caspasa-3 en los pacientes sensibles al AAS. Esta diferencia significativa se mantuvo tras el ajuste de la edad. Resultados similares se observaron en los niveles citosólicos de citocromo c. Al inicio no hubo diferencias entre pacientes sensibles y resistentes. Sin embargo, a los 60 minutos las plaquetas

de pacientes sensibles presentaron niveles mayores, lo cual también se mantuvo tras el ajuste por edad (figura 13).

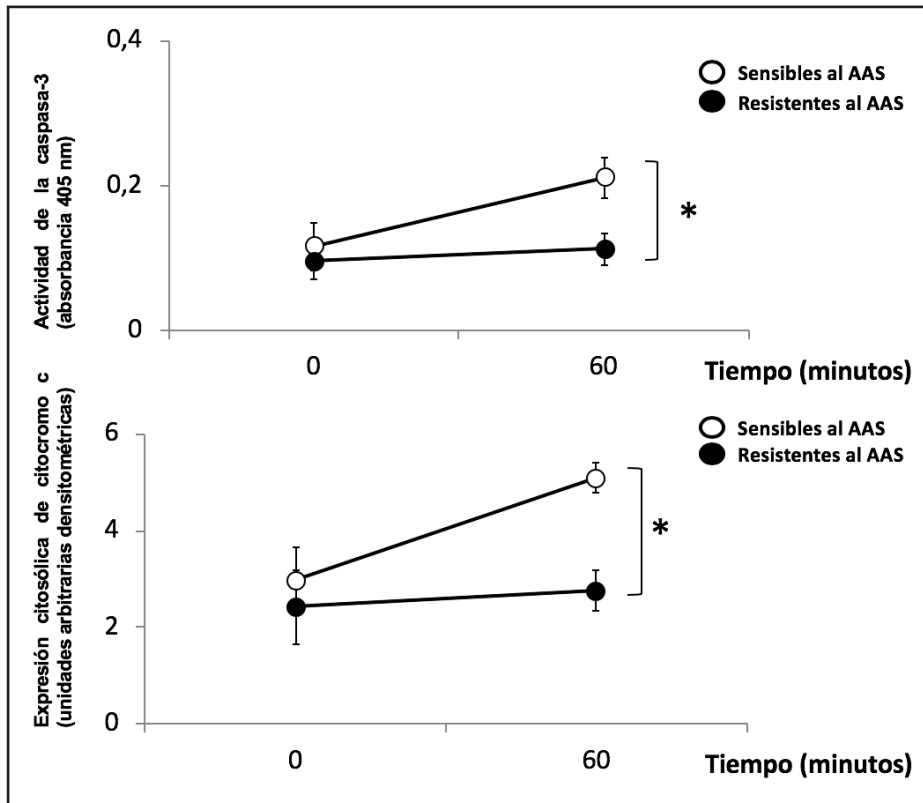


Figura 13. Actividad de la caspasa-3 y contenido citosólico de citocromo c en plaquetas sensibles y resistentes al ácido acetilsalicílico (AAS) estimuladas con ionóforo de calcio.

8. DISCUSIÓN

La primera parte de este estudio demuestra, por primera vez, que las plaquetas formadas *de novo* a partir de megacariocitos expuestos a baja concentración de AAS, similar a la obtenida en pacientes cardiovasculares tratados crónicamente con éste⁹⁷, poseen una concentración de la proteína ONS3 superior respecto a las PPL derivadas de megacariocitos no expuestos a la aspirina. Es más, las PPL obtenidas de megacariocitos incubados con AAS también mostraron diferencias significativas en el nivel de expresión de proteínas asociadas al estrés oxidativo y procesos apoptóticos respecto a las PPL derivadas de megacariocitos no expuestos.

Se han asociado dos mecanismos principales con el efecto antiplaquetar del AAS: la inhibición de la COX1 plaquetar, que reduce así la capacidad de producir TXA₂, por una parte, y la estimulación de la liberación de ON desde las propias plaquetas, lo que aumenta la actividad de la ONS3^{97,106-110}. La inhibición de las plaquetas humanas *ex vivo* se consigue con dosis tan bajas como 75 mg diarios. Con ello se inactiva la COX plaquetar, acetilando irreversiblemente la enzima, y se impide que pueda producir TXA₂, lo cual induce el efecto antiagregante. Por otro lado, en otros tejidos la COX lleva a la formación de PG, las cuales pueden de por sí anular la activación plaquetar. La PGI₂ es un potente agente vasodilatador y antiagregante que se produce en el seno del endotelio vascular. Se ha llegado a sugerir que la sensibilidad tisular a la inactivación de la COX es altamente variable, y así la aspirina puede modificar selectivamente la capacidad de producir PG. El efecto de la inhibición de la COX es irreversible, aunque el recambio enzimático permite recobrar la función en el endotelio vascular *in vitro*. Es más, la COX plaquetar puede ser más sensible que la enzima vascular a la inactivación del AAS, por lo que sería posible lograr una anulación selectiva, dosis-dependiente de la síntesis de TX mientras que la síntesis de PGI₂ endotelial permanecería relativamente intacta. Por otro lado, se ha publicado que la inhibición de la síntesis de TX es mayor que la de PGI₂, independientemente de la dosis de AAS administrada, aunque ninguna dosis consigue

el primer efecto exclusivamente, es decir, sin afectar en mayor o menor medida a la vía de la PGI₂¹⁰⁶.

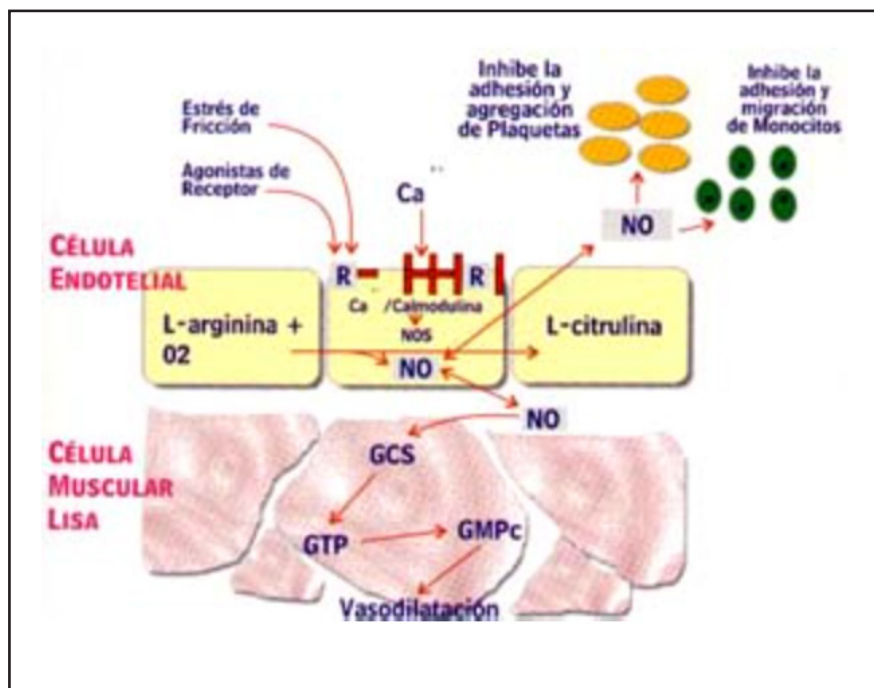


Figura 14. Síntesis y efectos del óxido nítrico (NO) sobre las plaquetas.

GMPc: guanosín monofosfato cíclico. GTP: guanosín trifosfato.

GCS: guanilato ciclasa soluble (Forero J).

El ON liberado por las plaquetas es uno de los principales inhibidores de la agregación, secreción y reclutamiento de las plaquetas en el trombo en formación (figura 14)^{107,110}. Interviene en la regulación del tono vascular y de la presión arterial y en la neurotransmisión del sistema nervioso central, y previene la trombosis en un modelo de daño glomerular producido por endotoxinas. Se relaciona con la regulación de la función plaquetar, pues la agregación se estimula con la incubación con inhibidores de la ONS y se inhibe con la presencia del sustrato de la ONS, la L-arginina. La liberación de ON por parte de plaquetas activadas parece ser similar a la de las células endoteliales. En adultos sanos, un suplemento oral de L-arginina muestra un efecto antiagregante, reversible con la incubación *ex vivo* con monometil-L-

arginina, la cual inhibe selectivamente la síntesis de ON y estimula la agregación al actuar sobre la L-arginina. No se han descrito cambios endoteliales, por lo que parece probable que la L-arginina produce un aumento específico a nivel plaquetar de la producción de ON. Numerosos estudios han sugerido que el AAS puede cambiar la expresión de ONS3 en las células sanguíneas. Se ha publicado que los neutrófilos de pacientes que toman AAS poseen niveles mayores de la proteína ONS3 que los que no lo toman, y se ha especulado con que este factor se asocia a una menor incidencia de IAM durante un episodio coronario agudo^{111,112}. Es más, las plaquetas de pacientes sensibles con una isquemia coronaria estable también tienen una mayor concentración de la proteína ONS3 respecto a las resistentes¹⁰³.

La síntesis de ON ocurre en las células endoteliales vasculares, neutrófilos, macrófagos y glándulas adrenales, entre otros. El ON activa la guanilato ciclasa, aumenta la concentración de guanosín 3':5'-monofosfato (GMPc) cíclico y regula la respuesta de las plaquetas al colágeno (figura 15). Este efecto está potenciado por M&B22948, inhibidor selectivo de la GMP cíclico fosfodiesterasa, y por una concentración subumbral de PGI2.

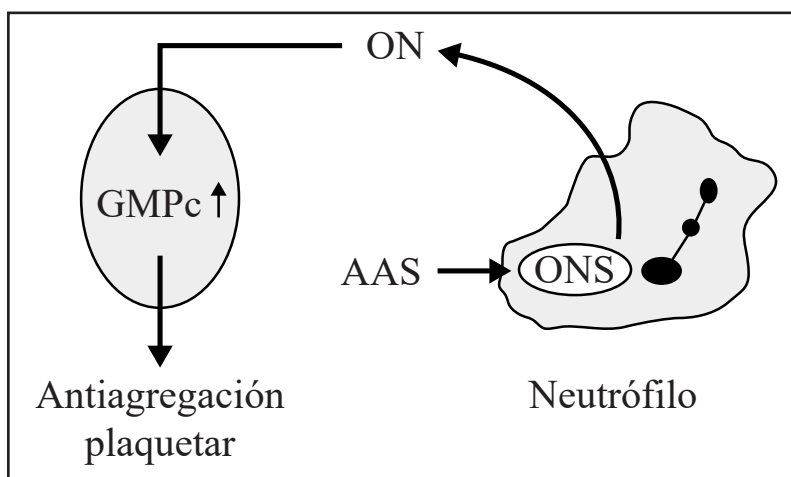


Figura 15. Interacción neutrófilo-plaqueta.

GMPc: guanosín monofosfato cíclico. ON: óxido nítrico. AAS: ácido acetilsalicílico. ONS: óxido nítrico sintasa (López Farré A).

Otros agregantes, como ARA y ADP, activan la síntesis de ON. Es más, inhibidores de la ONS potencian la agregación inducida por ellos. Existen al menos dos ONS diferentes en distintos tejidos: la enzima cerebral-endotelial y la enzima de los fagocitos. La primera es NADPH y calcio-dependiente, y no se afecta por la L-canavanina, mientras que la segunda no es calcio-dependiente, es inhibida por la L-canavanina y necesita tetrahidrobiopterina además de NADPH. La ONS plaquetar pertenece al primer grupo, dado que requiere calcio. La agregación plaquetar *in vivo* está probablemente regulada por el ON plaquetar y el ON y la PGI₂ liberados desde el endotelio vascular. La acción combinada de estos dos mediadores podría dar lugar a un aumento de la formación de GMP cíclico y adenosín monofosfato (AMP) cíclico, respectivamente, con la subsecuente inhibición de la agregación¹⁰⁹. Es interesante destacar que varios estudios describen la liberación de ON por parte de las plaquetas agregadas. Los factores de riesgo coronarios se han asociado a niveles bajos de ON plaquetar liberado. Una menor respuesta de la plaqueta al ON ha sido descrita como factor predictivo de mortalidad y morbilidad cardiovasculares en pacientes con síndrome coronario agudo, aunque la deficiencia de alguna ONS no se asocia a trombosis espontánea en trabajos experimentales y sí a fibrinólisis, atribuible a la falta de inhibición dependiente de ON de la liberación de los cuerpos de Weibel-Palade. El ON no sólo inhibe la agregación plaquetar, sino que también evita la adhesión al endotelio, junto con la PGI₂. El ON exógeno ha demostrado inhibir el aumento de la expresión de proteínas de superficie plaquetares como la P-selectina o el complejo GPIIb/IIIa. Una elevación de la expresión de P-selectina aumenta la adhesión plaquetar a los monocitos e induce la expresión de factor tisular, un desencadenante de la coagulación. La inhibición de la expresión de P-selectina de la superficie plaquetar atenúa el acúmulo de leucocitos y el subsecuente depósito de fibrina *in vivo*¹¹⁰. Todo ello subraya la extrema complejidad de la homeostasis vascular dependiente del ON.

Las especies de oxígeno reactivas (EOR) estimulan e incrementan la activación plaquetar¹¹³, al contrario que ocurre con las de nitrógeno. La actividad de la NADPH oxidasa, que genera SO, es una fuente importante de EOR en las plaquetas¹¹⁴. Éstas contienen también proteínas de defensa antioxidante, y mantienen así un balance entre síntesis y catabolismo de EOR. Dado que el oxígeno destruye el factor relajante derivado del endotelio, el cual es un potente inhibidor de la adhesión y agregación plaquetares, es posible que la producción de oxígeno por parte de las plaquetas module su función en la hemostasia al favorecer su agregación. Sin embargo, el papel del estrés oxidativo en la función plaquetar no está claramente establecido. Debido a que la función plaquetar se ha implicado en el desarrollo de arteriosclerosis y en la oclusión coronaria aguda, los procesos oxidativos y el estado redox de las plaquetas pueden tener efectos mayores en la homeostasis vascular. El mecanismo exacto por el que producen alteraciones en la enfermedad coronaria sigue siendo desconocido. Los estudios de experimentación animal sugieren que los antioxidantes preservan la actividad del ON en presencia de estrés oxidativo. La agregación plaquetar se asocia a un consumo explosivo de oxígeno, así como a un aumento de la concentración de glutatión disulfido. Aunque los cambios en el estado redox se producen en la agregación, es probable que algunas condiciones que favorezcan el estrés oxidativo sin llegar a producir una respuesta agregante florida puedan ser protrombóticas. El SO, por ejemplo, reduce la actividad del ON: al reaccionar ambos, el ON se transforma en otros compuestos y se limita su acción. Además, aumenta la respuesta a la agregación, al igual que altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. La trombina estimula la despolarización de la membrana mitocondrial y la generación de peróxido de hidrógeno. Es más, la apoptosis inducida por trombina puede estar mediada, al menos parcialmente, por la generación de peróxido de hidrógeno en las plaquetas. Las plaquetas, al activarse, pueden producir EOR con ayuda de la NADPH oxidasa, las cuales aumentan la activación de la GPIIb/IIIa pero no la secreción de gránulos densos o alfa. Los inhibidores de la NADPH oxidasa y los captadores del SO también reducen la agregación plaquetar y la formación de colágeno en

el trombo. Asimismo, el colágeno induce la liberación de SO dependiente de NADPH oxidasa, lo que aumenta la captación plaquetar. Una elevación de su producción aparece en dislipemias y otras enfermedades relacionadas con la disfunción endotelial. Así, el aumento de EOR puede incentivar el estrés oxidativo que estimula la peroxidación de los lípidos, la activación celular y, en último término, favorece la disfunción vascular.

Aunque los primeros trabajos hallaron una relación inversa entre el consumo de antioxidantes en la dieta y el desarrollo de enfermedad coronaria, estudios recientes han presentado resultados contradictorios. Se ha llegado a asociar con accidentes hemorrágicos, lo que sugeriría una inhibición plaquetar. Algunos efectos de la terapéutica antioxidante pueden ser atribuibles a cambios en la respuesta trombótica. Las plaquetas poseen varios sistemas de defensa contra la oxidación, entre ellos la SOD, la cual juega un papel importante en la normalización de la función plaquetar y la prevención de trombosis. En este apartado, está bien establecido que la SOD, enzima con gran especificidad para el catabolismo del SO, inhibe la adhesión plaquetar inducida por la trombina, así como la agregación¹¹⁵. Los antioxidantes pueden poseer efectos plaquetares inhibitorios captando las EOR. La depleción de glutatión reduce la actividad de la glutatión peroxidasa y aumenta la peroxidación de los lípidos. En individuos sanos, un suplemento de selenio eleva los niveles de glutatión peroxidasa y aumenta el tiempo de hemorragia. Un contenido bajo de antioxidantes se asocia a un aumento de la respuesta de las plaquetas; lo mismo ocurre con el incremento de la edad. La hiperactividad derivada del consumo de tabaco se relaciona con un aumento de la formación de hidroperóxidos lipídicos. El alfatocoferol inhibe la agregación y la liberación de 5-hidroxitriptamina. A pesar de que suplementos de vitamina E obtuvieron resultados esperanzadores al reducir la progresión de la lesión coronaria, estudios posteriores no demostraron beneficios, e incluso los asociaron a fenómenos hemorrágicos.

La homeostasis de calcio en plaquetas de pacientes diabéticos no insulino dependientes está modificada, lo que lleva a un aumento de la adhesión y agregación espontáneas. Este efecto puede alterarse con inhibidores de las EOR. Los radicales de peróxido y peróxido de hidrógeno están relacionados con el aumento de la movilización de calcio observada en estos pacientes, lo que llevaría a un aumento de la agregación y de la activación plaquetar.

Tanto la pravastatina como el AAS inhiben la expresión del receptor 1 de la LDL oxidada en las plaquetas, efecto en parte favorecido mediante la formación de EOR y la liberación de ON en las plaquetas activadas. La inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa también mejora la función endotelial, aumenta la disponibilidad del ON y reduce la activación plaquetar en el fallo cardíaco en experimentación animal. Los inhibidores de la GPIIb/IIIa, alterando la agregación, producen una translocación en la membrana de las proteínas ONS3 y NADPH oxidasa, las cuales, como ya se ha descrito, contribuyen a la formación de ON y SO, respectivamente.

El dipiridamol suprime la síntesis de EOR en plaquetas y células endoteliales y aumenta el estado redox, y estimula la inhibición plaquetar amplificando las señales de donantes de ON.

Los flavonoides poliméricos, presentes en el vino tinto, poseen propiedades antioxidantes. Extractos de la piel de la uva alteran la liberación de intermediarios de reactivos de oxígeno, lo que conlleva un aumento de la liberación de ON y una reducción en la producción de SO. Es más, la incubación de plaquetas con los citados extractos lleva a una limitación inmediata de la liberación de sCD40L, mediador de la inflamación¹¹⁶.

En nuestro estudio, la concentración de ONS3 y la liberación de nitrito + nitrato (como medida indirecta del ON) fueron significativamente mayores en PPL si las células Meg-01 habían sido incubadas en presencia de AAS. Por otro lado, en las PPL formadas *de novo* los niveles de expresión proteica del receptor de TXA2 y la concentración de TXB2 fueron similares, independientemente de si los megacariocitos precursores hubiesen sido o no incubados con AAS. En conjunto, estos resultados podrían sugerir que, durante la estimulación de la generación de PPL a partir de megacariocitos, la presencia de AAS no modificó el sistema de producción de TXA2, pero sí aumentó la capacidad enzimática de las plaquetas neoformadas para producir ON. Además, el efecto distinto del AAS en la producción de TXA2 y de ON refleja la especificidad de los resultados obtenidos.

Por otro lado, el contenido de gp91-phox NADPH oxidasa estaba disminuido, y el de SOD, aumentado, en las PPL originadas por las células Meg-01 expuestas al AAS, en comparación con las no expuestas. Estos resultados podrían sugerir que durante la estimulación de las células Meg-01 para formar nuevas plaquetas, la presencia de AAS promueve la generación de plaquetas con un estado oxidativo reducido, lo que hipotéticamente podría contribuir para formar plaquetas con una mayor capacidad antioxidante. Al respecto, otros trabajos han asociado previamente la presencia de AAS con efectos antioxidantes, e incluso se ha documentado que el propio AAS puede ser un eficiente eliminador de radicales hidroxilo, mayor incluso que otros antioxidantes ya conocidos^{117,118}.

Probablemente el dato más llamativo observado en este estudio *in vitro* sea que las PPL derivadas de los megacariocitos expuestos al AAS presentaron niveles superiores estadísticamente significativos de las proteínas apoptóticas Bax y Bak que las PPL derivadas de megacariocitos no expuestos. A pesar de tratarse de células anucleadas, las plaquetas podrían sufrir también apoptosis¹¹⁹. Existen linfocitos que pueden vivir años, los eritrocitos viven meses

y las plaquetas, días, lo cual refleja su papel fisiológico, así como el estrés al que son expuestas. Interesante es recalcar que la persistencia de células que deberían ser destruidas contribuye a la génesis de enfermedades autoinmunes y cáncer.

Los factores que regulan la biogénesis plaquetar se conocen desde hace tiempo, no así los que controlan su vida media. Expresan varios miembros de la familia Bcl-2, formada por pequeñas proteínas globulares y, en respuesta a diversos estímulos, exhiben características propias de la muerte celular. Es más, su propia muerte está circunscrita por el inicio de la apoptosis. La proteína Bcl-xl, miembro de la familia Bcl-2, es la llave de la supervivencia plaquetar, aunque no es requerida en absoluto para la proliferación y la diferenciación de los megacariocitos. Su papel en el vertido de las plaquetas a la circulación sigue siendo una incógnita. Su alteración, farmacológica o genética, reduce la vida media plaquetar y causa trombocitopenia dosis-dependiente. Bak y Bax son proteínas que también forman parte de la familia Bcl-2. El mayor mediador de la muerte plaquetar es Bak. Su delección, o la de Bax, aumenta la vida media plaquetar y exagera los efectos del antagonismo de Bcl-xl tanto *in vivo* como *in vitro*. Bcl-xl reduce la actividad proapoptótica de Bak para mantener la supervivencia plaquetar, pero al ir degradándose, las plaquetas viejas son orientadas hacia su muerte. La delección de Bak corrige estos defectos, y así plaquetas de ratón carentes de Bak viven más tiempo. De ello resulta que las plaquetas están genéticamente programadas para morir por apoptosis. El balance entre Bcl-xl y Bak decreta la vida media plaquetar, hecho crucial en la homeostasis celular por sus implicaciones diagnósticas y terapéuticas. Es decir, la cantidad de Bcl-xl que una plaqueta hereda sería lo que determina su vida media. Al ir degradándose paulatinamente con el tiempo, se alcanzaría un umbral a partir del cual se comenzaría a liberar Bak, lo que induciría su apoptosis, en ausencia de estímulos externos. Es conveniente resaltar dos hechos: que la proteína Bcl-xl se degrada más rápidamente que Bak, y que ésta permanece constante en el tiempo, mientras que Bcl-xl va desapareciendo progresivamente. Un tercer

punto interesante sería que la desaparición de Bcl-xl está condicionada por la temperatura. Así, a 22 °C, la concentración de Bcl-xl permanece invariable. Se ha demostrado que la inhibición, incluso total, de las caspasas (cistenil aspartil proteasas), las enzimas encargadas de la demolición, es incapaz de retrasar la inviabilidad plaquetar producida en los orgánulos, especialmente en las mitocondrias, por Bak. Aunque los mecanismos moleculares podrían diferir, este paradigma del control de la muerte celular podría aplicarse a distintas estirpes celulares¹²⁰.

Dos vías distintas llevan a la apoptosis en las células nucleadas: una extrínseca, que transduce una señal apoptótica tras la interacción de receptores letales con ligandos en la superficie celular, y una intrínseca, desencadenada por cambios en la integridad mitocondrial, que incluye la despolarización del potencial transmembrana mitocondrial y la liberación de factores proapoptóticos, tales como el citocromo c, del espacio intermembrana mitocondrial, supeditadas al control de las proteínas pro- y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (figura 16). Tras su liberación, el citocromo c actúa junto a proteínas citosólicas, Apaf-1 y la caspasa-9 para activar la caspasa-3. Sin embargo, también las células anucleadas sufren apoptosis. En las plaquetas se ha identificado la vía intrínseca, desencadenada por cambios en los mecanismos relacionados con la apoptosis, tales como la estimulación de la actividad de la caspasa-3¹²¹⁻¹²². Es conocido que el tratamiento de plaquetas con agonistas no fisiológicos como, por ejemplo, el ionóforo A23187 o la ionomicina, induce efectos propapoptóticos como la despolarización del potencial transmembrana mitocondrial, expresión de proteínas de la familia Bcl-2, activación de la caspasa-3 y exposición a la fosfatidilserina (FS), punto en común de las dos vías apoptóticas, intrínseca y extrínseca.

La trombina, agonista plaquetar, es un factor coagulante que convierte el fibrinógeno en fibrina, paso decisivo para la formación del trombo. Se ha demostrado que la estimulación

del receptor 1 activado por proteasa (RAP1) por la trombina modula la apoptosis de las células nucleadas. Es más, no sólo posee efectos en la coagulación y la activación y agregación plaquetares: es posible que pueda desencadenar la apoptosis plaquetar por los mismos mecanismos que la ionomicina.

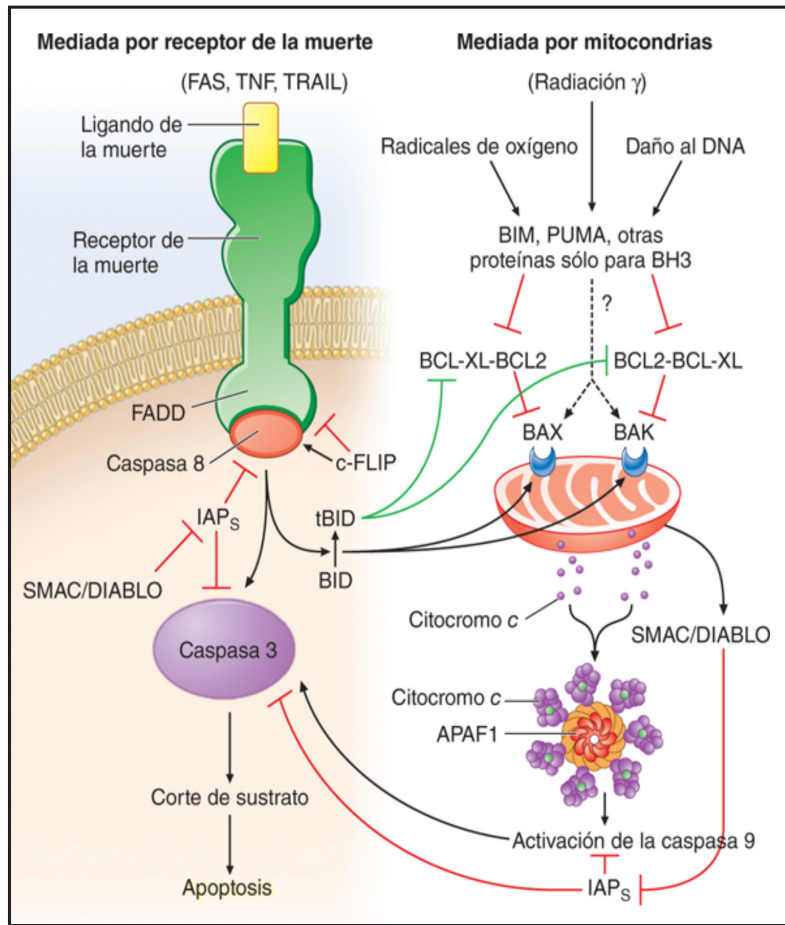


Figura 16. Vías de apoptosis celular (Kasper DL).

Si así fuera, la interacción entre la trombina y RAP1 podría ser el mecanismo desencadenante de la vía externa de la apoptosis plaquetar, y contribuiría de este modo a la fisiopatología de la trombocitopenia en enfermedades como sepsis y coagulación intravascular diseminada, las cuales cursan con una producción aumentada de trombina¹²³.

Las plaquetas contienen mitocondrias heredadas de los megacariocitos, nucleados, durante la trombopoyesis, lo cual garantiza su metabolismo energético. Al carecer de núcleo no poseen ADN nuclear pero, como ya hemos descrito, tienen transcriptores del ARNm y ribosomas, necesarios para la síntesis de proteínas. La trombina aumenta la presencia de las proteínas Bak y Bax, y podría provocar la apoptosis plaquetar al modificar el balance que existe entre las proteínas pro- y antiapoptóticas de las proteínas de la familia Bcl-2, en favor de la apoptosis. Y, al igual que ocurre en las células nucleadas, podría ser mediada por el RAPI.

Paradójicamente, los experimentos indicaron que, a pesar de que las PPL derivadas de células Meg-01 expuestas al AAS poseían una expresión superior de proteínas Bak y Bax y, por ello, potencialmente debían mostrar mayor predisposición a la apoptosis, exhibían una actividad de la caspasa-3 y unos niveles citosólicos de citocromo c semejantes a las PPL generadas a partir de megacariocitos no expuestos. Estos resultados, en conjunto, podrían estar sugiriendo que, a pesar de que la presencia del AAS en megacariocitos puede promover que las plaquetas neoformadas conserven una mayor maquinaria molecular de la apoptosis plaquetar, los biomarcadores indicativos de apoptosis no se modifican. Zhao *et al.* relacionaron el AAS con la apoptosis plaquetar, a pesar de que, a diferencia de otros trabajos, incubaron directamente plaquetas en AAS, y demostraron la activación de la caspasa-3 en éstas. Es más, los autores utilizaron concentraciones como mínimo diez veces superiores a las empleadas en nuestro estudio¹²⁴.

En la segunda parte de nuestro trabajo se intentó analizar si los cambios aparecidos en las PPL de las proteínas proapoptóticas podían también ser observados en plaquetas sensibles y resistentes al AAS de pacientes tratados crónicamente con éste, pues en trabajos previos de nuestro grupo se evidenció que las plaquetas sensibles y las resistentes contienen una cantidad

diferente de proteínas específicas. Esto sugiere que los megacariocitos pueden dar lugar a distintos tipos de plaquetas con una capacidad diferente de respuesta al AAS^{102,103}.

Las plaquetas sensibles al AAS mostraron una expresión superior significativa de la proteína proapoptótica Bak que las plaquetas resistentes. El contenido de Bax fue a su vez mayor en las plaquetas sensibles. Sin embargo, la significación estadística con respecto a las plaquetas resistentes desapareció tras el ajuste por edad. Al igual que lo observado previamente en los trabajos *in vitro*, la actividad de la caspasa-3 fue semejante en ambos grupos plaquetares. Es importante recalcar al respecto que Bak interacciona con Bax para promover la apoptosis plaquetar al regular su vida media y, por ello, una concentración superior de Bak podría facilitar dicha interacción¹¹⁹. Así, el denominado suicidio celular controlado asegura que las células crecen y se multiplican en el contexto adecuado, y que sean retiradas cuando sea necesario como, por ejemplo, si son irreparablemente dañadas. En ese caso, se activa un sistema de suicidio celular que garantiza eficacia y el menor daño posible para retirar las células no requeridas. Ya hemos señalado que esa apoptosis se puede iniciar por factores extrínsecos, como es el caso de ligandos de receptores letales de la superficie celular, o intrínsecamente, en respuesta a lesión o estrés. En ambos casos la apoptosis clásica activa las caspasas, que rápidamente destruyen la célula. Se hallan presentes en condiciones normales como proenzimas inactivas, preparadas para inducir la destrucción celular al ser activadas. Generalmente, la apoptosis tiene lugar a través de la vía intrínseca, cuyo punto de no retorno es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (PMME), lo que conlleva la liberación de factores solubles como el citocromo c del espacio intermembranoso, que activan las caspasas. Las proteínas de la familia Bcl-2 son las principales moduladoras de la PMME, aunque ésta no sea su única diana, ya que también pueden actuar sobre el retículo endoplasmático, entre otros. De ahí que sea básico el ensamblaje correcto de Bcl-2 con la mitocondria. Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 se hallan en la membrana mitocondrial externa (MME), y previenen la apoptosis inhibiendo

la activación de Bax y Bak. Entre ellas destacan Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w y Mcl-1, las cuales poseen dominios homólogos Bcl-2 (HB) 1-4. En la línea proapoptótica se incluyen Bax, Bak y Bok, que contienen dominios HB1-3, y HB3, una subfamilia que puede inhibir las proteínas antiapoptóticas o activar directamente a Bax y Bak. Éstas promueven la PMME formando oligómeros que dan lugar a poros dentro de la MME. Bid, Bim y Bad, por el contrario, actúan como activadores directos de Bax y Bak o reprimiendo las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl. La proteína proapoptótica multidominio Bak se localiza en la MME. Por otra parte, Bax se halla en el citosol y, en menor medida, en las mitocondrias, y es captada por la MME en respuesta a una señal apoptótica. El traslado de Bax a la mitocondria no conlleva la PMME¹²⁵.

Basados en el diseño experimental presente, *a priori* es ciertamente dificultoso explicar estos datos. El papel de la apoptosis en las plaquetas no está claramente establecido, aunque es mandatorio clarificar que la activación plaquetar y su apoptosis no son necesariamente fenómenos asociados¹²⁶. En trabajos experimentales con animales, la apoptosis se ha descrito tanto en plaquetas circulantes como almacenadas, y se especuló con la posibilidad de que pudiera ser un mecanismo de eliminación¹²⁷. Las señales relacionadas con la apoptosis de las plaquetas senescentes siguen sin ser conocidas totalmente. En modelos de experimentación animal, la supervivencia plaquetar se ha acortado con lesiones vasculares repetidas que llevaban a trombosis y tromboembolias. La degranulación plaquetar con trombina posee poco o ningún efecto sobre su supervivencia. Y dado que la trombina da lugar a la aparición de P-selectina en la superficie plaquetar, parece razonable que ésta no sea una señal apoptótica. Por el contrario, la FS sí juega un papel importante en su eliminación. El tratamiento con el ionóforo A23187, que promueve el paso de FS desde la membrana plasmática plaquetar interna a la externa, lleva a una eliminación completa y rápida de las plaquetas. Así, la sobreexpresión de FS podría estar relacionada con la eliminación de las plaquetas senescentes. En contraste, la activación con trombina produce una mínima exposición en la superficie de FS y no afecta a la supervivencia

plaquetar. Es posible que la expresión de FS en las plaquetas activadas, lo cual aumenta la formación de trombina, pueda ocurrir independientemente de un proceso general apoptótico que incluya el colapso de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (PMMI). Las plaquetas senescentes poseen una expresión superior de FS en su superficie y una pérdida de la PMMI, pero no existe un aumento en la expresión de P-selectina. Sin embargo, dichas plaquetas, al igual que las plaquetas activadas *in vitro*, pueden exhibir una expresión de FS independientemente de la pérdida de la PMMI. Y así, la expresión de FS no es necesariamente sinónimo de apoptosis. Las plaquetas senescentes presentan una menor respuesta a la trombina y son menos efectivas en la hemostasia, dada su respuesta disminuida al colágeno. Rand *et al.* no encontraron una subpoblación plaquetar con una PMMI colapsada en ausencia de expresión de FS en plaquetas estimuladas *in vitro* con ionóforo A23187 o ionomicina, lo que indica que el envejecimiento en la circulación implica distintos mecanismos a los que aparecen cuando se estimulan con ionóforo de calcio¹²⁷. Es conocido que el almacenamiento prolongado reduce la supervivencia plaquetar cuando vuelven a la circulación. Al menos se requieren siete días de almacenamiento antes de que sea evidente la presencia de FS. Sigue en entredicho si existe una pérdida de la PMMI. En resumen, la expresión de FS y la pérdida de PMMI, dos biomarcadores de la apoptosis, se asocian a una reducción de la supervivencia plaquetar en células tratadas con A23187. Las plaquetas senescentes presentan sobreexpresión de FS y pérdida de la PMMI. La expresión de FS, que promueve la coagulación, puede darse independientemente del colapso de la PMMI, y viceversa.

Se publicó con anterioridad que la incubación de plaquetas humanas con ionóforo de calcio favorecía la actividad de la caspasa-3 y la apoptosis plaquetar, y así se sugería que la gran activación plaquetar es necesaria para promover su apoptosis^{123,126}. Por ello se puede especular con la idea de que las plaquetas con una maquinaria proapoptótica mejor preparada podrían ser

más sensibles a la entrada en un programa apoptótico bajo condiciones de gran estimulación plaquetar que las plaquetas que no mostraran ese fenotipo proapoptótico.

En este trabajo, el ionóforo de calcio estimuló la actividad de la caspasa-3, lo que se acompañó de una mayor liberación de citocromo c en las plaquetas sensibles que en las resistentes. Ambos mecanismos han sido asociados a apoptosis celular^{128,129}. El citocromo c posee la función doble de controlar el metabolismo energético y la apoptosis. La activación de la cascada de las caspasas comienza con la liberación citosólica del citocromo c desde el espacio intermembranoso mitocondrial. Ello conduce a una interacción con factores activadores de proteasa apoptóticas, lo que, en presencia de dATP o ATP, consigue la activación proteolítica de la procaspasa-9. La caspasa-9 activa la caspasa-3, la cual produce alteraciones morfológicas en el núcleo, fragmentación del ADN e irrupción de la FS en la superficie celular. En conclusión, la liberación de citocromo c mitocondrial, tras producirse la alteración de la membrana externa, proporciona una señal que inicia la muerte celular de modo irreversible.

El daño mitocondrial se ha relacionado con la muerte celular. Los inhibidores de la respiración mitocondrial que inducen la pérdida del potencial de membrana pueden producir un fallo energético, aumento de la concentración de calcio y de EOR, pérdida del poder osmótico y muerte celular. A diferencia de lo que ocurre en la necrosis, la mitocondria en la apoptosis presenta una estructura prácticamente normal, y podría considerarse un requisito de eliminación celular controlada¹²⁸.

Todos estos resultados unidos podrían sugerir que en situaciones de una activación plaquetar plena, como ocurre tras la estimulación de A23187, es plausible que las plaquetas sensibles al AAS puedan con más facilidad inducir su propia apoptosis. Por ello, como hipótesis de este mecanismo, éstas podrían delimitar y controlar el crecimiento del trombo en

situación de máxima actividad plaquetar mejor que las plaquetas resistentes. Estudios *in vitro* anteriores han sugerido que altas concentraciones de AAS inducen la apoptosis de diversas células, incluyendo plaquetas^{128,130}. Estos datos de laboratorio podrían estar relacionados con la observación clínica de que pacientes tratados crónicamente con AAS, si sufren un síndrome coronario agudo es más frecuente que se trate de una angina inestable que de un IAM.

En nuestro conocimiento, con este trabajo se demuestra por primera vez que las plaquetas de los pacientes tratados crónicamente con AAS a bajas dosis poseen diferencias en sus características apoptóticas dependiendo de la respuesta de sus plaquetas al AAS. Obviamente, el diseño experimental de este estudio no asegura en ningún momento, y tampoco es su finalidad, que este fenotipo apoptótico distinto de plaquetas basado en su respuesta antitrombótica al AAS es debido a una acción del mismo en los megacariocitos. Pero no debemos olvidar que los experimentos *in vitro* que utilizaron células Meg-01 ya sugerían que la presencia del AAS producía que los megacariocitos originasen plaquetas caracterizadas por su asociación a un menor crecimiento del trombo durante la activación plaquetar, junto a una expresión superior de ONS3, modificaciones en las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y un aumento de la expresión de las proteínas apoptóticas Bax y Bak.

9. COMENTARIOS Y LIMITACIONES

Es importante resaltar que, en los experimentos *in vitro*, el AAS sólo se aplicó cuando los megacariocitos fueron estimulados con PMA. Se diseñó así el estudio intentando minimizar la exposición de las nuevas PPL al AAS. En este caso, con independencia de que las células Meg-01 fueran incubadas en presencia y en ausencia de AAS, las PPL neoformadas contenían niveles similares de TXA₂. El hecho de que el nivel de expresión de algunas proteínas específicas fue modificado en esas PPL mientras que otras no sufrieron esas variaciones apoya la especificidad de los cambios observados.

El efecto antiagregante, como ya se ha explicado, no es igual en todos los pacientes. Hasta un 60% de la población no presenta una respuesta adecuada, lo cual se denomina insensibilidad o resistencia a la aspirina. Las cifras oscilan notablemente en función de factores como el tamaño muestral, las pruebas utilizadas o los criterios definitorios de la propia resistencia. Esta condición se asocia a un incremento de accidentes cardiovasculares, y se ha descrito su relación con los niveles de glucosa en ayunas y con la concentración de HbA_{1c} en pacientes diabéticos, los cuales tienen en su enfermedad un factor de riesgo independiente de patología arterial coronaria. Varias publicaciones han asociado un control subóptimo de la glucemia con la resistencia al AAS: Liu *et al.* encontraron que un nivel elevado de glucemia en ayunas es un factor de riesgo independiente de la resistencia a la aspirina. Asimismo, hallaron niveles superiores de LDL en el grupo de pacientes resistentes¹³¹. Siguiendo con el perfil lipídico, se ha relacionado la concentración baja de HDL con el síndrome coronario agudo, y se ha descrito como factor predictor independiente de resistencia. Con ello se constata la necesidad de controlar los niveles lipídicos en pacientes con dislipemia.

Por otro lado, los pacientes con plaquetas resistentes al AAS eran ligeramente mayores que los pacientes con plaquetas sensibles. A pesar de que los datos acerca de cómo la edad puede inducir resistencia plaquetar son escasos, diversos trabajos han sugerido que un número

elevado de ancianos con enfermedad cardiovascular son resistentes a la terapia con AAS¹³¹. También en nuestro estudio parece que existe una tendencia a que, entre los pacientes mayores, haya más resistencia. Es decir, los pacientes de edad avanzada podrían no beneficiarse de dosis bajas. Para descartar el impacto de la edad en los resultados obtenidos, ésta fue utilizada como covariante en el análisis lineal de regresión.

Se ha publicado que el incremento en la dosis condiciona una disminución de la prevalencia de la resistencia. Sin embargo, otros estudios concluyen que bajas dosis de AAS (75-150 mg diarios) son tan efectivas como las altas a la hora de reducir el número de accidentes vasculares. Así, es posible que esas dosis altas no proporcionen una inhibición adicional de la COX1.

Una limitación de nuestro trabajo es que este experimento no reveló los mecanismos moleculares posibles relacionados en los cambios mediados por AAS en la expresión de proteínas en las PPL formadas *de novo*. Aunque la identificación de los citados mecanismos está fuera del alcance de este estudio, en las líneas celulares de megacarioblastos humanos se observó que el AAS puede modificar la expresión del receptor alfa activador de la proliferación de peroxisomas y, por ello, sus genes diana, y alterar el contenido proteico de las plaquetas circulantes¹³².

Otra restricción evidente es el número de pacientes estudiados. Sin embargo, los resultados fueron contundentes, aunque son necesarios más análisis que incluyan un número superior de pacientes. Finalmente, es obligatorio enfatizar que en ningún caso se intenta demostrar que las diferencias apoptóticas halladas entre las plaquetas sensibles y resistentes podría relacionarse con cambios en los niveles de megacariocitos. Se requieren otros estudios, más específicos, para poder realizar tal afirmación. A pesar de ello, se ha demostrado con este

trabajo que la presencia de AAS puede hacer que los megacariocitos modifiquen el contenido de proteínas específicas en las plaquetas neoformadas.

En conclusión, la presencia del AAS durante la estimulación de megacariocitos para generar plaquetas parece favorecer que las neoformadas presenten cambios en el contenido de proteínas relacionadas con la producción y el catabolismo del SO, y un contenido mayor de proteínas ONS3. Es más, cuando los megacariocitos se incubaron con AAS, las plaquetas neoformadas habían aumentado a su vez el nivel de expresión de las proteínas apoptóticas Bax y Bak. Las plaquetas sensibles al AAS mostraron un fenotipo proapoptótico respecto al observado en las resistentes, lo cual favoreció la inducción de mecanismos relacionados con la apoptosis cuando fueron estimuladas con ionóforo de calcio. Un mejor conocimiento de nuevos mecanismos de acción del AAS sobre las plaquetas puede abrir nuevas estrategias y metas de la terapia antiplaquetar, y mejorar así el diseño de fármacos antiplaquetares futuros que actúen incluso en los megacariocitos.

10. CONCLUSIONES

1. No hay diferencias en la producción de TXA2 ni en la de su receptor plaquetario en las plaquetas generadas *de novo* de megacariocitos incubados en presencia de aspirina en comparación con las procedentes de los incubados en su ausencia.

2. La presencia de aspirina durante la generación de plaquetas desde el megacariocito hace que éstas tengan una mayor capacidad de generar ON.

3. Las plaquetas generadas *de novo* desde los megacariocitos incubados con aspirina tienen una maquinaria proapoptótica mayor que las plaquetas generadas de megacariocitos no incubados con aspirina. Sin embargo, los biomarcadores de estimulación de la apoptosis son semejantes entre estos dos grupos de plaquetas.

4. Las plaquetas sensibles a la aspirina expresan, en condiciones basales de no estimulación, niveles mayores de proteínas proapoptóticas respecto a las plaquetas resistentes a la aspirina.

5. En condiciones basales de no activación, las plaquetas sensibles y resistentes a la aspirina tienen niveles semejantes de biomarcadores indicadores de apoptosis (niveles de citocromo c en el citosol y actividad de la caspasa-3).

6. En condiciones de máxima estimulación plaquetar, las plaquetas sensibles a la aspirina tienen una mayor estimulación de los biomarcadores de apoptosis (liberación de citocromo c al citosol y actividad caspasa-3) que las plaquetas resistentes a la aspirina.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol Supl* 2013;13(B):2-7.
2. Eisenhardt SU, Haberberger A, Murphy A, Chen YC, Woollard KJ, Bassler N, et al. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2009;105:128-37.
3. Mauler M, Bode C, Duerschmied D. Platelet serotonin modulates immune functions. *Haemostaseologie* 2016;36:11-6.
4. Du G, Lin Q, Wang J. A brief review on the mechanisms of aspirin resistance. *Int J Cardiol* 2016;220:21-6.
5. López-Farré A, Farré J, Sánchez L, Romero J, Gómez J, Rico L, et al. Trombosis y enfermedad coronaria: neutrófilos, óxido nítrico y aspirina. *Rev Esp Cardiol* 1998;51:171-7.
6. Desborough M, Keeling D. The aspirin story- from willow to wonder drug. *British Journal of Haematology* 2017;177:674-83.
7. Kasotakis G, Pipinos II, Lynch TG. Current evidence and clinical implications of aspirin resistance. *J Vasc Surg* 2009;50(6):1500-10.
8. Jack DB. One hundred years of aspirin. *Lancet* 1997;350:437-9.
9. Stone E. An account of the success of the bark of the willow tree in the cure of agues. *Philos Trans R Soc Lond* 1763;53:195-200.

10. MacLagan TJ. The treatment of acute rheumatism by salicin. *Lancet* 1876;1:342-3 & 383-4.
11. Jeffreys D. *Aspirin: the remarkable story of a wonder drug*. 1.^a ed. Nueva York: Bloomsbury; 2004.
12. Eichengrün A. 50 Jahre Aspirin. *Pharmazie* 1949;4:582-4.
13. Douthwaite AH. Some recent advances in medical diagnoses and treatment. *Br Med J* 1938;1:1143-6.
14. Mortimer EA. Varicella with hypoglycaemia possibly due to salicylates. *Am J Dis Child* 1962;103:583-90.
15. Collier HO, Shorley PG. Analgesic antipyretic drugs as antagonists of bradykinin. *Br J Pharmacol Chemother* 1960;15:601-10.
16. Poole JC, French JE. Thrombosis. *J Atherosclerosis Res* 1961;1:251-82.
17. Schultze M. Ein heizbarer objectisch und seine verwendung bei untersuchungen des blutes. *Arch Mikroskop Anat* 1865;1:1-42.
18. Quick AJ. Salicylates and bleeding: the aspirin tolerance test. *Am J Med Sci* 1966;252:265-9.
19. Weiss HJ, Aledort LM. Impaired platelet-connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion. *Lancet* 1967;2(7514):495-7.

20. Hemler M, Lands WE. Purification of the cicloxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem* 1976;251(18):5575-9.
21. Craven LL. Acetylsalicylic acid, possible preventive of coronary thrombosis. *Ann West Med Surg* 1950;4(2):95.
22. 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(8607):349-60.
23. Antiplatelets Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy- 1. Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994;308(6921):81-106.
24. Hearnshaw SA, Logan RF, Love D, Travis SP, Murphy MF, Palmer KR. Acute upper gastrointestinal bleeding in the UK: patient characteristics, diagnoses and outcomes in the 2007 UK audit. *Gut* 2011;60(10):1327-35.
25. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359(9):938-49.
26. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359:848-51.

27. Patel JA, Bhatt DA, Chorawala MR, Deshpande SS, Shah GB. Aspirin resistance: molecular mechanisms and techniques. *IJPSR* 2011;2(7):1623-30.
28. Roth GJ, Calverley DC. Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood* 1994;83(4):885-98.
29. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *The pharmacological basis of therapeutics*: 11.^a ed. Nueva York:McGraw-Hill;2005.
30. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med* 1989;321(3):129-35.
31. Hennekens CH, Dalen JE. Aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease: current knowledge and future research needs. *Trends Cardiovasc Med* 2014;24(8):360-6.
32. Boonyabat K, Crowther MA. Aspirin in secondary prevention of recurrent venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 2015;39(3):392-4.
33. Sane DC, McKee SA, Malinin AI, Serebruany VL. Frequency of aspirin resistance in patients with congestive heart failure treated with antecedent aspirin. *Am J Cardiol* 2002;90(8):893-5.
34. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thromboelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(9):1705-9.

35. Stejskal D, Proková J, Lacnák B. Use of assessment of aggregation of thrombocytes induced by cationic propyl gallate to estimate recurrence of cardiovascular complications. *Vnitr Lek* 2004;50:591-9.
36. Weber AA, Przytulski B, Schanz A, Hohlfeld T, Schör K. Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets* 2002;13(1):37-40.
37. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet* 2006;367(9510):606-17.
38. Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy: *Nat Rev Drug discov* 2003;2(1):15-28.
39. Poston RS, Gu J, Brown JM, Gammie JS, White C, Nie L, et al. Endothelial injury and acquired aspirin resistance as promoters of regional thrombin formation and early vein graft failure after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131(1):122-30.
40. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002;105(14):1650-5.
41. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001;88(3):230-5.

42. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, et al. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994;25(12):2331-6.
43. Grottemeyer KH. Effects of acetylsalicylic acid in stroke patients. Evidence of nonresponders in a subpopulation of treated patients. *Thromb Res* 1991;63(6):587-93.
44. 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(9):2432-6.
45. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, et al. PFA-100 system: a new method of assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 1998;24(2):195-202.
46. Serebruany VL, Malinin AI, Oshrine BR, Sane DC, Takserman A, Atar D, et al. Lack of uniform platelet activation in patients after ischemic stroke and choice of antiplatelet therapy. *Thromb Res* 2004;113(3-4):197-204.
47. Assadian A, Lax J, Meixner-Loitch U, Hagmüller 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(6):1142-7.
48. Bowbrick VA, Mikhailidis DP, Stansby G. Value of thromboelastography in the assessment of platelet function. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003;9(2):137-42.

49. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002;324(7329):71-86.
50. Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, et al. Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J* 2004;147(2):293-300.
51. 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.
52. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
53. Sperr W, Huber K, Roden M. Inherited platelet glycoprotein polymorphisms and a risk of coronary heart disease in young central Europeans. *Thromb Res* 1998;90(3):117-23.
54. Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* 2000;31(3):591-5.
55. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(11):1980-7.
56. Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* 1999;353(9156):900.

57. 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(4):661-7.
58. Hillarp A, Lethagen S, Mattiasson I. Aspirin resistance is not a common biochemical phenotype explained by unblocked ciclooxigenase-1 activity. *J Thromb Haemost* 2003;1(1):196-7.
59. 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(6):979-84.
60. Akopov SS, Grigorian GS, Gabrielan ES. Dose-dependent aspirin hydrolysis and platelet aggregation in patients with atherosclerosis. *J Clin Pharmacol* 1992;32(2):133-5.
61. FitzGerald GA. Parsing an enigma: the pharmacodynamics of aspirin resistance. *Lancet* 2003;361(9357):542-4.
62. Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I. Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2003;108:37-42.
63. Li N, Wallen NH, Hjemdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. *Circulation* 1999;100(13):1374-9.
64. O'Donnell CJ, Larson MG, Feng D, Sutherland PA, Lindpaintner K, Myers RH, et al. Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham heart study. *Circulation* 2003;103:3051-6.

65. Maguire J, Thakkinstian A, Levi C, Lincz L, Bisset L, Sturm J, et al. Impact of COX-2 rs5275 and rs20417 and GPIIIa rs5918 polymorphisms on 90-day ischemic stroke functional outcome: a novel finding. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011;20(2):134-44.
66. Sokol J, Biringer K, Skerenova M, Hasko M, Bartosova L, Stasko J, et al. Platelet aggregation abnormalities in patients with fetal losses: the GP6 gene polymorphism. *Fertil Steril* 2012;98(5):1170-4.
67. Fernández-Cadenas I, Del Río-Espínola A, Giralt D, Domingues-Montanari S, Quiroga A, Mendióroz M, et al. IL1B and VWF variants are associated with fibrinolytic early recanalization in patients with ischemic stroke. *Stroke* 2012;43(10):2659-65.
68. Maguire JM, Thakkinstian A, Sturm J, Levi C, Lincz L, Parsons M, et al. Polymorphisms in platelet glycoprotein 1b α and factor VII and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Stroke* 2008;39(6):1710-6.
69. Renna NF, Diez ER, Lembo C, Miatello RM. Role of Cox-2 in vascular inflammation: an experimental model of metabolic syndrome. *Mediators Inflamm* 2013;2013:513251.
70. Timur AA, Murugesan G, Zhang L, Aung PP, Barnard J, Wang QK, et al. P2RY1 and P2RY12 polymorphisms and on-aspirin platelet reactivity in patients with coronary artery disease. *Int J Lab Hematol* 2012;34(5):473-83.
71. Shao J, Fu Y, Yang W, Yan J, Zhao J, Chen S, et al. Thromboxane A2 receptor polymorphism in association with cerebral infarction and its regulation on platelet function. *Curr Neurovasc Res* 2015;12(1):15-24.

72. Yalcinkaya E, Celik M. Evaluation of inflammatory conditions associated with aspirin resistance. *Ups J Med Sci* 2014;119(3):292–3.
73. Chen TM, Li J, Liu L, Fan L, Li XY, Wang YT, et al. Effects of heme oxygenase-1 upregulation on blood pressure and cardiac function in an animal model of hypertensive myocardial infarction. *Int J Mol Sci* 2013;14(2):2684–706.
74. Evangelista V, Manarini S, Di Santo A, Capone ML, Ricciotti E, Di Francesco L, *et al.* De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ Res* 2006;98:593–5.
75. Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davi G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev* 2012;13(1):27–42.
76. De Lemos JA, Wiviott SD, Murphy SA, Blazing MA, Lewis EF, Califf RM, et al. Evaluation of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III algorithm for selecting candidates for statin therapy: insights from the A to Z trial. *Am J Cardiol* 2006;98(6):739–42.
77. Karolczak K, Kamysz W, Karafova A, Drzewoski J, Watala C. Homocysteine is a novel risk factor for suboptimal response of blood platelets to acetylsalicylic acid in coronary artery disease: a randomized multicenter study. *Pharmacol Res* 2013;74:7–22.
78. Wang J, Chakrabarty S, Bui Q, Ruf W, Samad F. Hematopoietic tissue factor- protease-activated receptor 2 signaling promotes hepatic inflammation and contributes

to pathways of gluconeogenesis and steatosis in obese mice. *Am J Pathol* 2015;185(2):524–35.

79. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh P, 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(6):961-5.
80. 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(3):1003-7.
81. Butchanan MR, Schwartz L, Bourassa M, Brister SJ, Peniston CM. Results of the BRAT study- a pilot study investigating the possible significance of ASA non-responsiveness on the benefits and risks of ASA on thrombosis in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Can J Cardiol* 2000;16(11):1385-90.
82. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin “resistance” and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BJM* 2008;336(7637):195-8.
83. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, Van der Boom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167(15):1593-9.

84. Payne DA, Jones CI, Hayes PD, Webster SE, Ross Naylor A, Goodall AH. Platelet inhibition by aspirin is diminished in patients during carotid surgery: a form of transient aspirin resistance? *Thromb Haemost* 2004;92(1):89-96.
85. Webster SE, Payne DA, Jones CI, Hayes PD, Bell PR, Goodall AH, et al. Anti-platelet effect of aspirin is substantially reduced after administration of heparin during carotid endarterectomy. *J Vasc Surg* 2004;40(3):463-8.
86. 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(8):493-7.
87. Shantsila E, Lip GY. 'Aspirin resistance' or treatment non-compliance: which is to blame for cardiovascular complications? *J Transl Med* 2008;6:47.
88. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:230-7.
89. Wong S, Appleberg M, Ward CM, Lewis DR. Aspirin resistance in cardiovascular disease: a review. *Eur J Endovasc Surg* 2004;27(5):456-65.
90. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Allal J, Mauco G, et al. Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thromb Res* 2002;107(1-2):45-9.
91. Bhat DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006;354(16):1706-17.

92. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001;345(7):494–502.
93. Bellavance A. Efficacy of ticlopidine and aspirin for prevention of reversible cerebrovascular ischemic events. The ticlopidine aspirin stroke study. *Stroke* 1993;24(10):1452–7.
94. Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H, et al. Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1985;66(6):1384-92.
95. Takeuchi K, Ogura M, Saito H, Satoh M, Takeuchi M. Production of platelet-like particles by a human megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01). *Exp Cell Res* 1991;193(1):223-6.
96. Takeuchi K, Satoh M, Kuno H, Yoshida T, Kondo H, Takeuchi M. Platelet-like particle formation in the human megakaryoblastic leukaemia cell lines, MEG-01 and MEG-01s. *Br J Haematol* 1998;100(2):436-44.
97. López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M, et al. Effects of Aspirin on platelet-neutrophil interactions: Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995;91(7):2080-8.
98. Isakari Y, Sogo S, Ishida T, Kawakami T, Ono T, Taki T, et al. Gene expression analysis during platelet-like particle production in phorbol myristate acetate-treated MEG-01 cells. *Biol Pharm Bull* 2009;32(3):354-8.

99. O'Brien JJ, Spinelli SL, Tober J, Blumberg N, Francis CW, Taubman MB, et al. 15-deoxy-delta12, 14-PGJ2 enhances platelet production from megakaryocytes. *Blood* 2008;112(10):4051-60.
100. Ortega A, Pérez de Prada MT, Mateos-Cáceres PJ, Ramos Mozo P, González-Armengol JJ, González del Castillo JM, et al. Effect of parathyroid-hormone-related protein on human platelet activation. *Clin Sci (Lond)* 2007;113(7):319-27.
101. López-Farré AJ, Zamorano-León JJ, Segura A, Mateos-Cáceres PJ, Modrego J, Rodríguez-Sierra P, et al. Plasma desmoplakin I biomarker of vascular recurrence after ischemic stroke. *J Neurochem* 2012;121(2):314-25.
102. 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(1):160-70.
103. Modrego J, Azcona L, Martín-Palacios N, Zamorano-León JJ, Segura A, Rodríguez P, et al. Platelet content of nitric oxide synthase 3 phosphorylated at Serine 1177 is associated with the functional response of platelets to aspirin. *PLoS One* 2013;8(12):e82574.
104. Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2008;6(3):444-50.

105. López-Farré AJ, Modrego J, Azcona L, Guerra R, Segura A, Rodríguez P, et al. Nitric oxide from mononuclear cells may be involved in platelet responsiveness to aspirin. *Eur J Clin Invest* 2014;44(5):463-9.
106. FitzGerald GA, Oates JA, Hawiger J, Maas RL, Roberts LJ 2nd, Lawson JA, et al. Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *J Clin Invest* 1983;71(3):676-88.
107. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(13):5193-7.
108. Taubert D, Berkels R, Grosser N, Schröder H, Gründemann D, Schömig E. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. *Br J Pharmacol* 2004;143(1):159-65.
109. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990;101(2):325-8.
110. 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(2):350-6.
111. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, Farré J, Sánchez de Miguel L, Gómez J, de Andrés R, et al. 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(12):895-900.

112. García-Dorado D, Théroux P, Tornos P, Sambola A, Oliveras J, Santos M, et al. Previous aspirin use may attenuate the severity of the manifestation of acute ischemic syndromes. *Circulation* 1995;92(7):1743-8.
113. Caccese D, Praticò D, Ghiselli A, Natoli S, Pignatelli P, Sanguigni V, et al. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation—role of arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost* 2000;83(3):485-90.
114. Delaney MK, Kim K, Estevez B, Xu Z, Stojanovic-Terpo A, Shen B, et al. Differential roles of the NADPH-oxidase 1 and 2 in platelet activation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(5):846-54.
115. Salvemini D, de Nucci G, Sneddon JM, Vane JR. Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br J Pharmacol* 1989;97(4):1145-50.
116. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(3):11-6.
117. López-Farré A, Riesco A, Digiuni E, Mosquera JR, Caramelo C, de Miguel LS, et al. Aspirin-stimulated nitric oxide production by neutrophils after acute myocardial ischemia in rabbits. *Circulation* 1996;94(1):83-7.
118. Shi X, Ding M, Dong Z, Chen F, Ye F, Wang S, et al. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol Cell Biochem* 1999;199(1-2):93-102.

119. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007;128(6):1173-86.
120. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev* 2012;26(2):51-63.
121. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281(5381):1305-8.
122. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-90.
123. Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *J Thromb Haemost* 2006;4(12):2656-63.
124. Zhao L, Zhang W, Chen M, Zhang J, Zhang M, Dai K. Aspirin induces platelet apoptosis. *Platelets* 2013;24(8):637-42.
125. Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(4):532-9.
126. Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br J Haematol* 2013;161(2):245-54.
127. Rand ML, Wang H, Bang KW, Poon KS, Packham MA, Freedman, J. Procoagulant surface exposure and apoptosis in rabbit platelets: association with shortened survival and steady-state senescence. *J Thromb Haemost* 2004;2(4):651-9.

128. Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366(1-2):139-49.
129. Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(7):532-42.
130. Piqué M, Barragán M, Dalmau M, Bellosillo B, Pons G, Gil J. Aspirin induces apoptosis through mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett* 2000;480(2-3):193-6.
131. Liu XF, Cao J, Fan L, Liu L, Li J, Hu GL, et al. Prevalence of and risk factors for aspirin resistance in elderly patients with coronary artery disease. *J Geriatr Cardiol* 2013;10(1):21-7.
132. Massimi I, Guerriero R, Lotti LV, Lulli V, Borgognone A, Romani F, et al. Aspirin influences megakaryocytic gene expression leading to up-regulation of multidrug resistance protein-4 in human platelets. *Br J Clin Pharmacol* 2014;78(6):1343-53.