

ORIGINAL

Aspectos proteómicos y genéticos de la resistencia a la aspirina

Proteomics and genetics aspects of aspirin resistance

Mateos-Cáceres P J¹, Azcona L¹, Fernández-Ortiz A², Sacristán D¹, Bernardo E², Ramos-Mozo P¹, Alonso-Organ S¹, Fernández-Arquero M³, López-Farré A¹, Macaya C^{1,2}

Unidad de Investigación Cardiovascular¹ y Unidad Coronaria². Instituto Cardiovascular. Departamento de Inmunología³. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Analizar si existe alguna asociación entre la resistencia a aspirina (RA) y la presencia de polimorfismos genéticos de un único nucleótido (SNPs) en el gen de la COX-1, así como su relación con modificaciones en la expresión de proteínas plasmáticas en pacientes con enfermedad isquémica estable y tratamiento continuado de aspirina.

Materiales y métodos: Analizamos el proteoma plasmático de 19 pacientes sensibles, 19 resistentes. RA se definió mediante el sistema PFA-100. Se realizó electroforesis bidimensional (IPG 17cm, pH(4-7), geles SDS-PAGE 10%) y tinción con plata. Se analizaron cambios en tres SNPs (A-842G, C22T y C50T) en 50 pacientes sensibles, 33 resistentes y 83 controles mediante PCR a tiempo real.

Resultados: La expresión de cuatro isoformas de α 1-antitripsina estaba aumentada en los pacientes resistentes. No encontramos diferencias en la expresión de ceruloplasmina, precursor de haptoglobina, apolipoproteína AI y precursor de albúmina entre ambos tipos de pacientes. Ningún paciente presentó cambios en el SNP A-842G. La frecuencia de cambio en C22T y C50T fue relativamente baja con respecto a la población total.

Conclusiones: No encontramos asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen de la COX-1 y la peor respuesta a la aspirina. Los cambios en observados α 1-antitripsina podrían estar relacionados con un diferente estado inflamatorio entre ambos tipos de pacientes.

Palabras clave:

Resistencia a Aspirina, proteómica, polimorfismos genéticos.

Abstract

Aim: To evaluate the existence of a possible association between Aspirin resistance (AR), COX-1 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and the modifications in the plasma proteome of clinically stable coronary patients.

Materials and methods: AR was defined according to the PFA-100 assay. AR-sensitive and AR-resistant patients had been taken aspirin for the last 9 months. The proteomic study (19 AR-sensitive, 19 AR-resistant) was performed using IPG strips (17cm, pH 4-7), SDS-PAGE gels (10%) and silver staining. We study three SNPs (A-842G, C22T y C50T) in 50 AR-sensitive patients, 33 AR-resistant and 83 controls using a real-time PCR.

Results: The expression of four α 1-antitripsin isoforms was increased in the aspirin-resistant patients. No differences were found in the expression of ceruloplasmin, haptoglobin-precursor, apolipoprotein-AI and albumin-precursor between both groups of patients. The A-842G SNP was undetectable in all subjects. The remaining two SNPs (C22T y C50T) showed a low frequency with respect the global population.

Conclusions: The low SNPs frequencies were unlikely to explain the difference in aspirin responsiveness between both groups of patients. The changes in α 1-antitripsin could be linked with a different inflammatory state in these patients.

Key words:

Aspirin resistance, proteomics, genetic polymorphisms.

Correspondencia

C. Macaya
Unidad de Investigación Cardiovascular. Hospital Clínico San Carlos
Profesor Martín Lagos s/n. Madrid 28040. España
learinv.hcsc@salud.madrid.org



Introducción

A lo largo de los años, la aspirina ha demostrado ser un tratamiento muy eficaz en la prevención de los eventos cardiovasculares. De hecho, la aspirina es capaz de reducir hasta un 25% el riesgo de muerte, infarto o accidente cerebrovascular [1-3]. Desafortunadamente, este beneficio no es igual en todos los pacientes, existiendo una elevada proporción de pacientes que a pesar de tomar aspirina siguen sufriendo eventos aterotrombóticos. Aunque hoy en día aún no existe un criterio diagnóstico formal, a esta incapacidad de la aspirina de ejercer correctamente su efecto antiplaquetario se la conoce como «Síndrome de resistencia a la Aspirina».

Se ha estimado que entre un 8% y un 45% de los pacientes son resistentes a este fármaco [4]. Además, diversos estudios han demostrado que la resistencia a la aspirina influye de forma directa en el pronóstico de los pacientes cardiovasculares, mostrando este tipo de pacientes mayor riesgo cardiovascular a largo plazo [5,6].

A nivel molecular, la aspirina ejerce su principal efecto antitrombótico inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa-1 plaquetaria (COX-1) mediante la acetilación de una serina localizada en la posición 529 del sitio catalítico de la COX-1, bloqueando así la síntesis de tromboxano-A₂ (TxA₂) en las plaquetas [7]. Son muy diversos los mecanismos potenciales que se han propuesto para tratar de explicar la resistencia a la aspirina, aunque realmente, el mecanismo por el que ocurre este fenómeno sigue siendo desconocido. Se han descrito factores tanto clínicos como farmacodinámicos y biológicos relacionados con la resistencia a la aspirina [8]. Sin embargo, diversos autores hablan de la posible existencia de variaciones o diferencias a nivel genético como la principal causa de la diferente respuesta de las plaquetas de estos pacientes a la aspirina [9,10].

Entre los posibles factores genéticos implicados en la mejor o peor respuesta a la aspirina existen descritas varias mutaciones y/o polimorfismos en los genes que codifican para la COX-1, COX-2 y la glicoproteína plaquetaria (GP) IIb/IIIa. [11]. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado recientemente la importancia del polimorfismo de la glicoproteína plaquetaria GP IIb/IIIa en el grado de activación de las plaquetas e incluso en la variabilidad del efecto antitrombótico a fármacos como el clopidogrel [12].

Identificar a los pacientes no respondedores a aspirina y alcanzar niveles adecuados de inhibición de sus plaquetas con terapias alternativas tiene interés clínico ya que en la actualidad no disponemos de biomarcadores que nos permitan identificar fácilmente a este tipo de pacientes. Re-

cientemente, nuestro grupo ha descrito mediante proteómica una clara asociación e implicación de algunas proteínas plasmáticas con el fallo de este fármaco en producir la respuesta biológica esperada en este tipo de pacientes. Como continuación a este trabajo, en el presente estudio nos propusimos analizar si existe alguna asociación entre resistencia a la aspirina y la presencia de polimorfismos genéticos de un único nucleótido (SNPs) en el gen de la COX-1, así como su relación con modificaciones en la expresión de proteínas plasmáticas.

Material y métodos

El estudio proteómico se llevó a cabo en un total de 38 pacientes (19 sensibles y 19 resistentes). Para el estudio genético se analizaron 88 pacientes (50 resistentes y 33 sensibles). En ambos casos, se trataba de pacientes con enfermedad isquémica estable sometidos a un tratamiento continuado de 100 mg/día de aspirina. Los pacientes fueron divididos en resistentes y sensibles a aspirina clasificados según el sistema PFA-100 [13]. Los pacientes estuvieron tomando aspirina durante al menos los últimos nueve meses y habían sufrido el evento coronario agudo al menos nueve meses antes de la inclusión en el estudio. Un criterio de exclusión fue el tratamiento con otros fármacos antitrombóticos o antiinflamatorios no esteroideos 30 días antes de la inclusión en el estudio.

Las muestras de sangre fueron obtenidas durante la mañana 2 a 4 horas tras la toma de aspirina mediante punción antecubital. Los primeros 3-4 ml fueron descartados para evitar activación plaquetaria espontánea. Las muestras sanguíneas se recogieron en tubos con citrato tanto para el análisis mediante el sistema PFA-100 y el análisis de polimorfismos genéticos. La muestra de sangre para la obtención de plasma se recogió en un tubo con EDTA.

Todos los pacientes recibieron una dosis adicional de Aspirina (100 mg) y una hora después se obtuvo otra muestra de sangre para desarrollar de nuevo el ensayo PFA-100 y reforzar los resultados obtenidos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos y todos los pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Clasificación de los pacientes sensibles y resistentes a la aspirina

Los pacientes resistentes a aspirina fueron clasificados mediante el empleo del sistema PFA-100 (Dade Behring W. Sacramento, USA) [14]. El sistema PFA-100 se basa en el empleo de cartuchos con una membrana de colágeno tratados con epinefrina (10 µg). La sangre obtenida en citrato es

aspirada por una aguja que somete a la muestra a unas elevadas condiciones de flujo (5000 a 6000 s⁻¹) a través de una pequeña apertura (150 µg) que existe en la membrana de cada uno de los cartuchos. El tiempo necesario para la oclusión de la apertura, definido como «tiempo de taponado» (CT), es un indicador de la función plaquetaria de la muestra sanguínea. De acuerdo con el fabricante del equipo, rangos en el tiempo de taponado comprendidos entre 94 y 193 segundos con cartuchos de epinefrina identifican pacientes resistentes a aspirina [15]. En pacientes sensibles a aspirina los tiempos de taponado de cartuchos con epinefrina son superiores y tras un periodo de 300 segundos el proceso automáticamente se detiene, siendo por lo tanto el límite superior de medida del equipo 300 segundos.

Determinación de Proteína C Reactiva

Se determinó la concentración plasmática de la proteína C reactiva (PCR) en cada uno de los pacientes según las técnicas rutinarias empleadas en nuestro centro.

Electroforesis bidimensional (2-DE)

Se analizó mediante electroforesis bidimensional un total de 500 µg de proteína total presente en el plasma [13]. La primera dimensión se realizó mediante el empleo de tiras IPG con un gradiente de pH inmovilizado de pH 4-7. Mediante la utilización de un equipo para electroforesis bidimensional Protean IEF Cell System (Bio-Rad Labs) se lleva a cabo la primera dimensión [16,17]. En la segunda dimensión, las proteínas presentes en cada gel IPG se resuelven mediante otro paso de electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% mediante el empleo del sistema PROTEAN II XL (Bio-Rad Laboratorios). Los geles se sometieron a un proceso de tinción con plata (Silver-Stain Plus Kit, Bio-Rad Labs).

Adquisición de imagen y análisis

Los geles bidimensionales una vez teñidos se escanearon para su posterior análisis. El escáner empleado para la obtención de la imagen fue un UMAX POWERLOOK III que opera con el programa Magic Scan V 4.5 específico para el escaneo de geles e imágenes bidimensionales. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó mediante el empleo de un software específico denominado Quantity-One 4.2.3 de Bio-Rad Laboratories. La intensidad de cada uno de los puntos analizados se procesó mediante el correspondiente método de sustracción o eliminación de fondo, y la intensidad total de cada punto se normalizó con el correspondiente valor de intensidad de la albúmina presente en el mismo gel, es decir, en el mismo paciente [13].

Espectrometría de masas

Los puntos de interés fueron recortados y extraídos manualmente de los geles [16]. Para realizar la identificación de cada uno de los puntos de interés mediante espectrometría de masas, cada punto se sometió a un proceso de reducción en el gel, alquilación, y por último digestión con tripsina [13]. Los análisis llevados a cabo mediante MALDI-TOF MS se desarrollaron en un aparato MALDI-tandem 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, Massachusetts). Todas las masas de los espectros obtenidos fueron calibradas externamente mediante una mezcla de péptidos estándar (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

La identificación de proteínas se realizó mediante comparación con la base de datos MASCOT DATABASE (Mascot database.http:// www.matrixscience.com.).

Estudio de polimorfismos genéticos de la COX-1

Para el estudio de polimorfismos genéticos estudiamos 50 pacientes sensibles y 33 resistentes. Se extrajo ADN genómico procedente de sangre periférica. El genotipado de los pacientes se realizó mediante estudio de diseño TaqMan en un equipo de PCR a tiempo real 7900 HT (Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystem Foster City, CA, USA). Se analizaron tres polimorfismos genéticos de un único nucleótido (SNPs) en el gen de la ciclooxigenasa 1 (COX-1), uno en la región promotora del gen (A-842G): primer forward 5'-TTCCTCCTTCTAGGTGCTTCCT-3', VIC- CTGGC-GAAAAGGAGA, primer reverse 5'-CGCCGAATTTATAGAAATCCCAGCAT-3', FAM-TGGCGAGAAGGAGA, y dos en la región codificante (C22T): primer forward 5'-GCTCAGCCCCTCATCTCTCT-3', VIC-CAAGAACCG-GAGCAAG, primer reverse 5'-GGAGCAGGAGCAGGAACAG-3', FAM-CAAGAACCAGAGCAAG y (C50T): primer forward 5'-CTCCGGTTCTTGCTGTTCT-3', VIC-CTGCTCCCGCCGCT, primer reverse 5'-GGTCCGC-GAGCAGGA-3', FAM-CTGCTCCTGCCGCT.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95° C durante 5 minutos, seguido de la fase cíclica de 35 ciclos a 95° C durante 1 minuto, 60° C durante 30 segundos y 72° C durante 30 segundos; y una última fase de 72° C durante 7 minutos.

Así mismo, también realizamos el genotipado de una población control (n=83), para comparar con nuestra población de estudio.

Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media ± error estándar de la media (eem). Para la determinación de significación

estadística realizamos test de Mann-Whitney para el análisis proteómico. En el caso del análisis genético se realizó el test de Chi-cuadrado con el programa Epi Info v. 6.02 (CDC Atlanta USA) para estudiar las diferencias entre los dos grupos de estudio. Se consideraron diferencias significativas a los valores de $p < 0.05$.

Resultados

Estudio del proteoma plasmático

Los 38 pacientes incluidos en el estudio proteómico fueron seleccionados basándonos en el hecho de que los tiempos de oclusión estuviesen en los rangos extremos para cada una de las dos condiciones de respuesta a Aspirina (Tabla 1). Los valores del tiempo de oclusión de cartuchos de epinefrina en el momento de inclusión y una hora tras la toma de una dosis de 100 mg de Aspirina se muestran en la tabla 1. Los pacientes incluidos en el estudio presentaban edad y factores de riesgo similares (Tabla 1), y todos ellos estaban recibiendo un tratamiento farmacológico similar en el momento de inclusión en el estudio.

Una vez obtenido el proteoma plasmático de cada uno de los pacientes, analizamos densitométricamente diferentes proteínas. Algunas proteínas fueron identificadas mediante comparación con los proteomas plasmáticos disponibles en la base de datos SWISS-2D (<http://www.expasy.ch/ch2d>). El análisis densitométrico de cada uno de los puntos se realizó usando el valor de la albúmina como valor normalizador [16]. En trabajos previos, tanto de nuestro grupo como de otros, algunas de las proteínas aquí analizadas han sido identificadas mediante espectrometría de masas y comparación con la base de datos (<http://www.matrixscience.com>) [16,18,19].

Mediante análisis por espectrometría de masas confirmamos la identidad de alguna de las proteínas plasmáticas

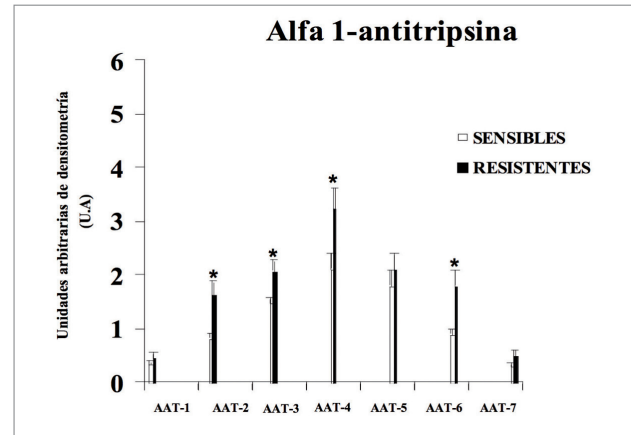


Fig. 1. Expresión de diferentes isoformas de α 1-antitripsina en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (AAT: α 1-antitripsina; U.A.: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

analizadas en el estudio: 2 isoformas del precursor de albúmina y dos isoformas de la proteína precursora de haptoglobina (Tabla 3).

En el proteoma plasmático de cada uno de los pacientes analizamos la expresión de varias proteínas relacionadas fundamentalmente con el grado inflamatorio, protección vascular y el estado oxidativo de este tipo de pacientes.

En primer lugar, analizamos la expresión de siete isoformas distintas de α 1-antitripsina (AAT). La expresión de las isoformas 2, 3, 4 y 6 de la AAT estaba aumentada de forma significativa en el plasma de los pacientes resistentes a Aspirina en comparación con los pacientes sensibles a Aspirina (Figura 1).

También analizamos la expresión de dos isoformas distintas del precursor de haptoglobina. No encontramos cambios significativos en la expresión de ninguna de las dos iso-

Tabla 1. Características de los pacientes estudiados mediante proteómica

	Sensibles (n=19)	Resistentes (n=19)	p
EDAD (años)	65 ± 9	66 ± 8	NS
FACTORES DE RIESGO (%)			
Fumadores	32 %	47 %	NS
Hipertensión	37 %	58 %	NS
Hiperlipemia	79 %	68 %	NS
Diabetes Mellitus	10 %	26 %	NS
Tiempo de oclusión en el momento de inclusión	>300	112.9 ± 21.0	-
Tiempo de oclusión una hora tras el tratamiento con Aspirina	>300	124.9 ± 27.1	-

(Media ± DS. NS: no significación estadística, $P > 0.05$).

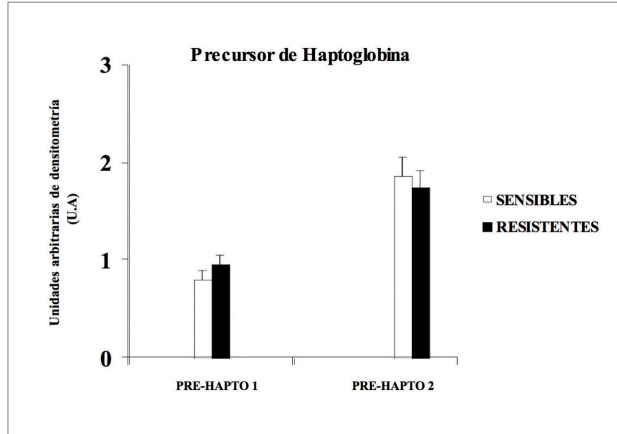


Fig. 2. Expresión de diferentes isoformas del precursor de haptoglobina en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (PRE-HAPTO: precursor de haptoglobina; U.A.: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

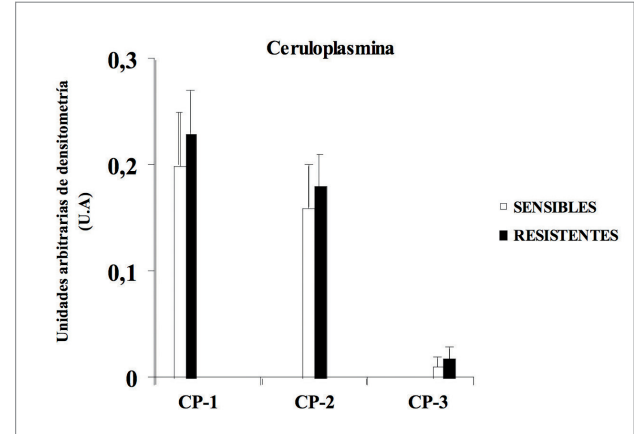


Fig. 3. Expresión de diferentes isoformas de ceruloplasmina en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (CP: ceruloplasmina; U.A.: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

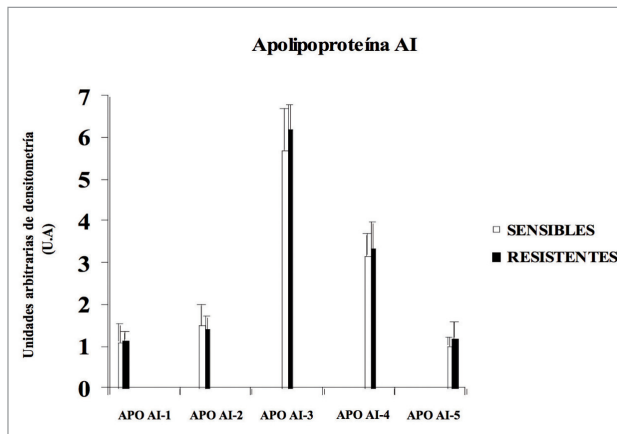


Fig. 4. Expresión de diferentes isoformas de la apolipoproteína-AI en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (APO AI: apolipoproteína-AI; U.A.: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

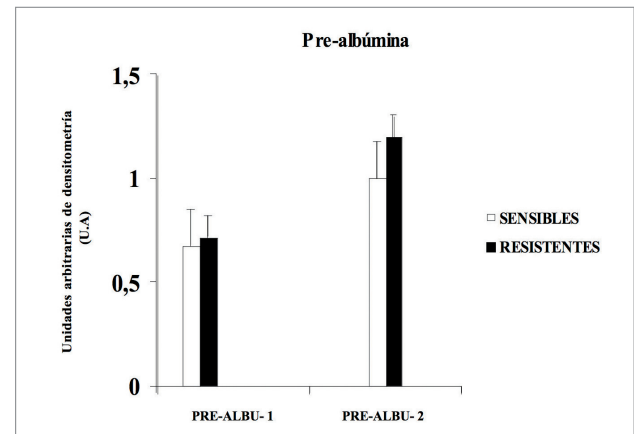


Fig. 5. Expresión de diferentes isoformas del precursor de albúmina en una población de pacientes sensibles y resistentes a la aspirina. (PRE-ALBU: precursor de albúmina; UA: Unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$ con respecto a los pacientes sensibles).

formas (Figura 2). Tampoco encontramos diferencias significativas en el nivel de expresión de tres isoformas distintas de una proteína, identificada mediante comparación con la base de datos SWISS-2D como ceruloplasmina (Figura 3).

Posteriormente, analizamos la expresión de cinco isoformas de la apolipoproteína-AI, cuya expresión fue muy similar entre ambos grupos de pacientes (Figura 4). Por último, la expresión de dos proteínas identificadas como precursor de albúmina fue similar entre ambos grupos de pacientes (Figura 5).

Análisis genético

En la segunda parte de este estudio nos centramos fundamentalmente en el análisis de la presencia de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en el gen de la COX-1 cuya presencia pudiese estar relacionada con cambios en la expresión y actividad de dicho enzima. Es importante destacar, que al igual que en el estudio proteómico, los pacientes fueron seleccionados basándonos en el hecho de que los tiempos de oclusión estuviesen en los rangos extremos para cada una de las dos condiciones de respuesta a Aspirina (Tabla 1).

Tabla 2. Análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) (% pacientes)

SNPs	HAPLOTIPOS	SENSIBLES	RESISTENTES	CONTROLES
TOTAL PACIENTES	-	50	33	83
NO POLIMÓRFICOS	ACC y ACC	44 (88%)	29 (87.8%)	69 (82.1 %)
C22T	ACC y ATC	3 (6.8%)	1 (3.4%)	7 (8.3 %)
C50T	ACC y ACT	3 (6.8%)	3 (10.3%)	7 (8.3 %)
C22T/ C50T	ACC y ATT	0	0	0
A-842G	ACC y GCC	0	0	0
A-842G/ C22T	ACC y GTC	0	0	0
A-842G/ C50T	ACC y GCT	0	0	0
A-842G/ C22T/ C50T	ACC y GTT	0	0	0

(NO POLIMÓRFICOS: individuos que no presentaron cambios en ninguno de los tres SNPs analizados (A-842G; C22T; C50T).

Tabla 3. Identificación del precursor de albúmina y el precursor de haptoglobina por espectrometría de masas

Proteína	Nº acceso base de datos	Método de identificación	Secuencia cubierta (%)	Baremo (%)
Precursor de Albúmina (PRE-HAPTO)				
PRE-HAPTO Isoforma 1	P02768	MS	16%	97.90
PRE-HAPTO Isoforma 2	P02768	MS	22	100
Precursor de Haptoglobina (PRE-HAPTO)				
PRE-HAPTO Isoforma 1	P00738	MS/MS	3%	74.40
PRE-HAPTO isoforma 2	P00738	MS/MS	7%	98.64

(MS: análisis mediante espectrometría de masas; MS/MS: Espectrometría de masas en tandem).

Analizamos la presencia cambios en tres SNPs en el gen de la COX-1 (A-842G, C22T Y C50T) (Figura 6) en una población compuesta por 50 pacientes sensibles a aspirina, 33 pacientes resistentes y una población control formada por 83 individuos del área de la Comunidad de Madrid, como representación de lo que puede ocurrir en la población española.

La tabla 2 muestra los distintos haplotipos analizados a partir de la combinación de los tres polimorfismos estudiados. Como se puede observar, nuestra población se caracterizó fundamentalmente por la baja frecuencia de polimorfismos en los tres grupos de pacientes analizados.

No observamos ningún individuo en nuestra población que presentara cambio de adenina (A) por guanina (G) en el caso del SNP-1 (A-842G) (Tabla 2). En el caso del SNP-2 (C22T) observamos como la presencia de este polimorfismo era mayor en los pacientes sensibles a la aspirina con respecto a los resistentes (6,8 % vs 3,4 %), aunque este porcentaje fue insignificante respecto a la población total (Tabla 2).

Respecto al tercer polimorfismo estudiado, SNP-3 (C50T), observamos una mayor presencia de este polimor-

fismo en los pacientes resistentes con respecto a los sensibles, aunque únicamente se trató de un 10,3 % en los pacientes resistentes con respecto a la población resistente total, que no presentaron cambio en ese polimorfismo.

Por lo tanto, no encontramos ninguna asociación entre resistencia/sensibilidad a la aspirina y la presencia de los tres polimorfismos de un único nucleótido analizados en el gen de la COX-1. La baja presencia de estos SNPs en nuestra población no explicaría la elevada incidencia de este síndrome (Figura 7).

Discusión

En la primera parte de este estudio, analizamos mediante proteómica, cambios en la expresión de proteínas plasmáticas relacionadas principalmente con la inflamación y el estrés oxidativo en pacientes con enfermedad coronaria estable sensibles y resistentes a Aspirina, que pudieran estar asociados con la diferente funcionalidad de sus plaquetas. Recientemente, nuestro grupo ha descrito en este mismo grupo de pacientes, la existencia de diferencias en el nivel de expresión de algunas proteínas plasmáticas, que parecen

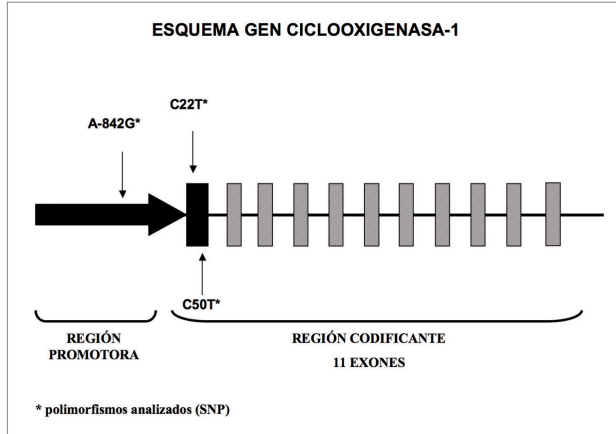


Fig. 6. Localización de los tres SNPs analizados en el estudio. El SNP-1 (A-842G) se encuentra localizado en la región promotora del gen; SNP-2 (C22T) y SNP-3 (C50T) se localizan la región codificante (exón 1) del gen de la COX.

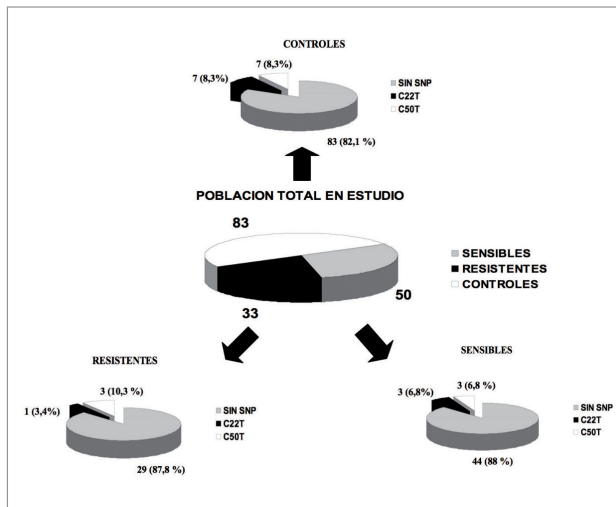


Fig. 7. Frecuencia polimórfica del gen de la COX-1 en la población representativa de la Comunidad de Madrid. Ningún caso presentó el SNP-1 (A-842G).

estar relacionadas de forma muy directa con la resistencia a la aspirina [13].

Hemos identificado y estudiado la expresión de diferentes isoformas de tres importantes proteínas de fase aguda como son la α 1-antitripsina, el precursor de haptoglobina y la ceruloplasmina, para analizar su posible utilidad como indicadores o marcadores bioquímicos que ayuden a la identificación de pacientes resistentes a la acción antiplaquetaria de la Aspirina. En primer lugar, observamos como la expresión de cuatro de las siete isoformas de la α 1-antitrip-

sina estaba aumentada de forma significativa en los pacientes resistentes con respecto a los sensibles. En esta misma línea, los niveles de esta proteína estaban también aumentados en el plasma de pacientes durante la fase aguda de un síndrome coronario agudo [16]. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en la expresión de ceruloplasmina y del precursor de haptoglobina entre los pacientes sensibles y resistentes a aspirina. Ambas proteínas están relacionadas de forma muy directa con la inflamación y el estado oxidativo [20,21]. Sin embargo, el papel y la posible implicación de estas proteínas en los eventos cardiovasculares aún no están completamente definida, aunque sí que se ha observado una estrecha correlación entre los niveles de expresión de estas proteínas de fase aguda y las concentraciones plasmáticas de PCR [22]. En este sentido, tampoco encontramos diferencias significativas en la concentración plasmática de PCR entre ambos grupos de pacientes (0.24 ± 0.03 mg/dl vs 0.22 ± 0.04 mg/dl).

No obstante, es importante destacar que en resultados anteriores de nuestro grupo observamos como la expresión de tres isoformas haptoglobina estaban aumentadas de forma significativa en el grupo pacientes resistentes [16]. Posiblemente, no hemos encontrado diferencias en la expresión del precursor de haptoglobina por tratarse de una molécula en un estadio funcional anterior al de la proteína final. Estos resultados y junto con los obtenidos en estudios anteriores muestran como, tal vez, el diferente nivel o grado de expresión de algunas de las proteínas definidas habitualmente como de fase aguda podría estar asociada con la peor respuesta plaquetaria a la aspirina que muestran este tipo de pacientes.

En este estudio, también identificamos 5 isoformas de la Apo-AI. Múltiples estudios atribuyen los efectos beneficiosos de las lipoproteínas de alta densidad a esta proteína. De hecho, la expresión de esta proteína se ha asociado con una mayor protección vascular [23,24]. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en la expresión de ninguna de las isoformas de la Apo-AI entre los pacientes sensibles y resistentes a aspirina. Del mismo modo, tampoco se encontraron cambios significativos en la expresión de otra apolipoproteína asociada a la protección vascular, la apolipoproteína-AIV, en este mismo tipo de pacientes [16]. Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos decir que no parecen existir diferencias, en cuanto a daño vascular, asociadas con la mejor o peor respuesta plaquetaria a la aspirina de ambos grupos de pacientes.

Por último, tampoco encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de dos isoformas del precursor de albúmina, un marcador nutricional [25], sugiriendo

un estado nutricional similar entre ambos grupos de pacientes. En la misma línea, tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de otra isoforma del precursor de albúmina, descrito en el primer estudio proteómico realizado con estos mismos pacientes.

Por otro lado, analizamos el gen de la COX-1 en búsqueda de posibles polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que pudieran estar asociados con la heterogeneidad en la respuesta plaquetaria a la aspirina en una población de pacientes con enfermedad isquémica establecida. En este sentido, la presencia de un SNP que conlleve cambio de aminoácido en el gen de la COX-1 podría alterar la actividad catalítica o la afinidad de este enzima por la aspirina. Así mismo, la presencia de SNPs en las regiones limítrofes exón-intrón puede influir de forma muy directa en el splicing del m-RNA del enzima. En este estudio analizamos la frecuencia de SNPs en el gen de la COX-1 tanto en la región promotora (A-842G), como en la región codificante (C22T y C50T) que pudieran estar asociados con la diferente respuesta plaquetaria que muestran este tipo de pacientes a la aspirina.

Nuestros resultados muestran que la frecuencia de estos SNPs es relativamente baja en nuestra población, comparado con los resultados obtenidos en otras poblaciones como la caucasiana o afroamericana [26], y sólo explicarían la peor respuesta a la aspirina en un pequeño porcentaje de la población. Por lo tanto, no encontramos ninguna asociación entre la mejor o peor respuesta plaquetaria a la aspirina y la presencia de los tres SNPs analizados.

Es importante destacar, que existe una gran controversia con respecto a la relevancia de la presencia de mutaciones en el gen de la COX-1 sobre la mejor o peor respuesta plaquetaria a la aspirina. En este sentido, Maree et al [27] demostraron que la existencia de polimorfismos en la región promotora del gen de la COX-1 (842G) estaba asociado a la resistencia a la aspirina [28]. Por otro lado, Halushka et al [11] mostraron como pacientes heterocigotos para el SNP C50T, mostraban una mayor inhibición de la formación de tromboxano por la aspirina. Sin embargo, Hillarp et al [28] tampoco encontraron SNPs en el gen de la COX-1 en pacientes no respondedores que habían sufrido un evento isquémico cerebral. En la misma línea de resultados, Takahashi et al [29] tampoco observaron ninguna asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen de la COX-1 y COX-2 y la peor respuesta a la aspirina que sirviera para explicar la alta incidencia de este síndrome en la población general.

Por lo tanto, serán necesarios más estudios tanto genéticos como proteómicos que proporcionen más información

sobre los posiblemente mecanismos y vías de acción implicadas en la diferente respuesta plaquetaria al tratamiento con aspirina. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García-Dorado D, Theroux 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: 1743-8.
2. Patrono C, García-Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2373-83.
3. Aspirin Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308: 81-106.
4. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *JACC* 2005; 46: 1705-9.
5. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105:1650-55.
6. Mason PJ, Jacobs AK, Freeman JE. Aspirin resistance and atherothrombotic disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:986-93.
7. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 2003; 110:255-8.
8. Goodman T, Sharma P, Ferro A. The genetics of aspirin resistance. *Int J Clin Pract* 2007; 61:826-34.
9. Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, Ginsburg G, Parker A, Kottke-Marchant K, et al. Aspirin resistance and a single gene. *Am J Cardiol* 2005; 95:805-8.
10. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006; 27:647-54.
11. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Pharmacogenetics and genomics. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2002; 73:122-30.
12. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Sabaté M, Fernandez C, et al. PIA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinol* 2004; 15:1-5.



13. López-Farré AJ, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D, Azcona L, Bernardo E, de Prada TP, et al. Relationship between vitamin D binding protein and aspirin resistance in coronary ischemic patients: a proteomic study. *J Proteome Res* 2007; 6:2481-7.
14. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabate M, Jiménez-Quevedo P, et al. Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *Am J Cardiol* 2006; 97:38-43.
15. 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; 88:230-5.
16. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López-Farré A, Macaya C, Nuñez A, Gomez J, et al. Proteomic analysis of plasma patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1578-83.
17. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristan D, et al. Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients. *J Proteome Res* 2006; 5:2301-8.
18. Sinz A, Bantscheff M, Mikkat S, Ringel B, Drynda S, Kew J, et al. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002; 23:3445-56.
19. Choi J, Malakowsky CA, Talent JM, Conrad CC, Gracy RW. Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293:1566-70.
20. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42:1589-600.
21. Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E. Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci* 1995; 56:1749-58.
22. Brunetti ND, Correale M, Pellegrino PL, Cuculo A, Biase MD. Acute phase proteins in patients with acute coronary syndrome: Correlations with diagnosis, clinical features, and angiographic findings. *Eur J Intern Med* 2007; 18:109-17.
23. Ramet ME, Ramet M, Lu Q, Nickerson M, Savolainen MJ, Malzone A, et al. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:2288-97.
24. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996; 94:713-7.
25. Walsh D, Mahmoud F, Barna B. Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: interleukin-6, C-reactive protein, and the prognostic and inflammatory nutritional index. *Support Care Cancer* 2003; 11:60-2.
26. Ulrich CM, Bigler J, Sibert J, Greene EA, Sparks R, Carlson CS, et al. Cyclooxygenase 1 (COX1) polymorphisms in African-American and Caucasian populations. *Hum Mutat* 2002; 20:409-10.
27. Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost* 2005; 3:2340-5.
28. Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I. Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin nonresponders with recurrence of stroke. *Thromb Res* 2003; 112:275-83.
29. Takahashi S, Ushida M, Komine R, Shimodaira A, Uchida T, Ishihara H, et al. Platelet responsiveness to in vitro aspirin is independent of COX-1 and COX-2 protein levels and polymorphisms. *Thromb Res* 2008; 121:509-17.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.