

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Influencia de seis polimorfismos del metabolismo de clopidogrel sobre la reactividad plaquetaria en pacientes con síndrome coronario agudo

D^a. María Henar García Lagunar
2016



**INFLUENCIA DE SEIS POLIMORFISMOS DEL METABOLISMO
DE CLOPIDOGREL SOBRE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA
EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

Tesis para optar al grado de Doctor

Presentada por:
María Henar García Lagunar

Dirigida por:
Dr. D. Luciano Consuegra Sánchez
Dr. D. Pablo Conesa Zamora

Universidad de Murcia
Programa de Doctorado de Facultad de Medicina

Murcia, 2016



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Luciano Consuegra Sánchez, Profesor Titular de Universidad del Área de Medicina Interna en el Departamento de Medicina Interna, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "INFLUENCIA DE SEIS POLIMORFISMOS DEL METABOLISMO DE CLOPIDOGREL SOBRE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO", realizada por Dña. María Henar García Lagunar, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de Octubre de 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luciano Consuegra Sánchez'.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Pablo Conesa Zamora, Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario Santa Lucía en el Departamento de Análisis Clínicos, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "INFLUENCIA DE SEIS POLIMORFISMOS DEL METABOLISMO DE CLOPIDOGREL SOBRE LA REACTIVIDAD PLAQUETARIA EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO", realizada por Dña. María Henar García Lagunar, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping strokes.

En Murcia, a 16 de Septiembre de 2016

Quiero expresar mi agradecimiento a Luciano y a Pablo, directores de este trabajo, por permitirme participar en este proyecto y por haberme guiado durante este tiempo. Gracias por las palabras de ánimo y por no permitir nunca que me desanime.

Gracias a todos los compañeros del Departamento de Hemodinámica y del grupo de Patología Molecular y Farmacogenética que han participado en este proyecto.

Gracias a mis compañeros del Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Santa Lucía, gracias a vosotros he crecido como profesional pero sobre todo como persona.

Gracias a mi familia y a mis amigos, por estar a mi lado y acompañarme en mil y una aventuras.

Gracias a mis padres, Aurelio y Emilia, por su cariño y motivación, sin los que de ningún modo hubiese podido llegar hasta aquí. Hemos demostrado que somos un equipo de tres.

Gracias por creer en mí.

Gracias a David, mi marido, mi compañero de viaje, por estar siempre ahí, en lo bueno y en lo malo, por escucharme incluso cuando no entendía ni una palabra, por aprender a decir clopidogrel y polimorfismo, porque sólo nos queda toda una vida por delante.

Índice

Abreviaturas	9
1. Introducción	13
1.1. Cardiopatía isquémica y Síndrome Coronario Agudo	15
1.2. Aterosclerosis	18
1.3. Aterotrombosis	20
1.4. Fisiología de la plaqueta	20
1.4.1. Fisiología de la hemostasia	20
1.4.2. Importancia del ADP	23
1.5. Clopidogrel	25
1.5.1. Mecanismo de acción	26
1.5.2. Posología	27
1.6. Ácido acetilsalicílico	29
1.7. Doble antiagregación plaquetaria	29
1.7.1. Duración de la doble terapia antiagregante	32
1.8. Resistencia al tratamiento	34
1.8.1. Factores que influyen en la variabilidad de la respuesta	36
1.8.1.1. Factores clínicos	37
1.8.1.2. Factores celulares	42
1.8.1.3. Factores genéticos	43
1.9. Farmacogenética	43
1.10. Farmacogenética del clopidogrel	46
1.10.1. Citocromo P450	47
1.10.1.1. CYP2C9	49
1.10.1.2. CYP2C19	50

1.10.1.3.	CYP3A4	52
1.10.1.4.	CYP1A2	53
1.10.1.5.	CYP2D6	53
1.10.2.	Paraoxonasa 1 (PON1)	54
1.10.3.	Otros	55
1.11.	Agregometría. Pruebas de función plaquetaria	57
2.	Justificación	61
3.	Hipótesis	65
4.	Objetivos	67
4.1.	Objetivo principal	67
4.2.	Objetivos secundarios	67
5.	Métodos	69
5.1.	Población	71
5.2.	Función plaquetaria	72
5.3.	Extracción del ADN	73
5.4.	Genotipado	75
5.4.1.	Genotipado mediante sondas TaqMan [®]	76
5.4.2.	Genotipado mediante sondas KASPar [®]	79
5.5.	Definiciones	81
5.6.	Análisis estadístico	82
5.7.	Seguimiento	84
6.	Resultados	85
6.1.	Características basales	87
6.2.	Valores de laboratorio	88
6.3.	Tratamiento con clopidogrel	89

6.4. Tratamiento concomitante	89
6.5. Angiografía	90
6.6. Medicación al alta	91
6.7. Polimorfismos.	92
6.8. Agregometría	93
6.9. Perfil del paciente con elevada reactividad plaquetar en tratamiento con clopidogrel	95
6.10. Análisis de regresión logística binaria no ajustada	100
6.11. Análisis multivariado	104
6.11.1. Discriminación de pobre respuesta a clopidogrel: variables clínicas y genéticas	105
6.12. Relación con el infarto peri-angioplastia coronaria	106
6.13. Episodios adversos durante el seguimiento	107
7. Discusión	111
7.1. Limitaciones	126
8. Conclusiones	127
Bibliografía	131

Índice de figuras

Figura 1. Mortalidad por cardiopatía isquémica en España.	15
Figura 2. Definición de síndrome coronario agudo.	17
Figura 3. Receptores y mecanismo de acción del clopidogrel.	25
Figura 4. Estructura química ticlopidina y clopidogrel.	26
Figura 5. Principal vía que conduce a la formación del metabolito activo del clopidogrel.	27
Figura 6. Mecanismo de acción del doble tratamiento antiagregante plaquetario.	30
Figura 7. Modelo que sugiere una ventana terapéutica para los inhibidores del receptor P2Y ₁₂ .	36
Figura 8. Mecanismos involucrados en la variabilidad de la respuesta a clopidogrel.	37
Figura 9. Interacciones farmacodinámicas que influyen en los niveles de metabolito activo.	39
Figura 10. Tipos de variaciones genéticas.	45
Figura 11. Principales proteínas implicadas en el transporte y el metabolismo de clopidogrel.	55
Figura 12. Sistema VerifyNow P2Y ₁₂ .	58
Figura 13. Aglutinación de las plaquetas a las microesferas de fibrinógeno.	58
Figura 14. Relación entre la reactividad plaquetaria y el riesgo de eventos isquémicos.	59
Figura 15. Funcionamiento de una sonda TaqMan [®] .	77
Figura 16. Representación de la intensidad de señal emitida por cada fluorocromo asociado a un alelo diferente.	79

Figura 17. Etapas del genotipado con sondas KASPar [®] .	80
Figura 18. Edad por grupos.	87
Figura 19. Factores de riesgo cardiovascular.	87
Figura 20. Curvas <i>Receiver Operating Characteristic</i> (ROC) para el modelo clínico, el modelo con variables clínicas y CYP3A4*1B y el modelo con variables clínicas y los seis polimorfismos.	106
Figura 21. Método de supervivencia de Kaplan Meier.	109

Índice de tablas

Tabla 1. Características de los polimorfismos estudiados.	75
Tabla 2. Composición de la mezcla de la reacción para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa.	78
Tabla 3. Comorbilidades.	88
Tabla 4. Datos de laboratorio al ingreso.	89
Tabla 5. Tratamiento concomitante intrahospitalario.	90
Tabla 6. Procedimiento intervencionista.	91
Tabla 7. Tratamiento farmacológico al alta.	92
Tabla 8. Distribución de frecuencias de los genotipos.	93
Tabla 9. Prevalencia de los polimorfismos hepáticos relacionados con el metabolismo de clopidogrel.	93
Tabla 10. Resultados de la agregometría para los polimorfismos hepáticos relacionados con el metabolismo de clopidogrel y reactividad plaquetar.	94
Tabla 11. Características basales de la población.	96
Tabla 12. Situación al ingreso.	97
Tabla 13. Tratamiento intrahospitalario.	98
Tabla 14. Datos angiográficos y función ventricular izquierda.	99
Tabla 15. Prevalencia de polimorfismos hepáticos relacionados con el metabolismo de clopidogrel.	100
Tabla 16. Análisis bivariante (características basales).	101
Tabla 17. Análisis bivariante (situación clínica al ingreso).	102
Tabla 18. Análisis bivariante (tratamiento con clopidogrel).	102
Tabla 19. Análisis bivariante (tratamiento médico intrahospitalario).	103
Tabla 20. Análisis bivariante (“datos angiográficos”).	103

Tabla 21. Análisis bivariante (polimorfismos hepáticos relacionados con el metabolismo de clopidogrel).	104
Tabla 22. Modelo multivariado clínico-genético de predicción de PRC.	105
Tabla 23. Distribución de polimorfismos en relación con la aparición de infarto peri-angioplastia.	107
Tabla 24. Eventos adversos tras el alta hospitalaria.	108
Tabla 25. Distribución de polimorfismos en relación con la aparición de eventos adversos tras el alta.	108

Abreviaturas

AAS: ácido acetilsalicílico

ACD: arteria coronaria derecha

ACTP: angioplastia coronaria transluminal percutánea

ACV: accidente cerebrovascular

ACX: arteria circunfleja

ADA: arteria descendente anterior

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosín difosfato

AF: antecedentes familiares

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

Anti H₂: antagonistas de los receptores H₂

ARAI: antagonistas de los receptores de angiotensina II

ATP: adenosín trifosfato

BMS (*"bare metal stent"*): stent metálico

CNV: variaciones en el número de copias

COX-1: ciclooxigenasa 1

CYP: citocromo P450

DE: desviación estándar

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfatados

ECG: electrocardiograma

ECM: episodios cardiovasculares mayores

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo

FRET: transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

GP IIb/IIIa: glucoproteína IIb/IIIa

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HTA: hipertensión arterial

IAM: infarto agudo de miocardio

IAMCEST: infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST

IAMSEST: infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST

IBP: inhibidores de la bomba de protones

IC 95%: intervalo de confianza del 95%

ICP: intervención coronaria percutánea

IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

IMC: índice de masa corporal

INDEL: inserciones o deleciones

IRC: insuficiencia renal crónica

Iso-TRAP: péptido activador del receptor de la trombina

LDL: lipoproteínas de baja densidad

MDRD: filtrado glomerular con la fórmula "*Modification of Diet in Renal Disease*"
abreviada

OR: odds ratio

PAR4-AP: péptido activador del PAR4

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGE1: prostaglandina E1

PON1: paraoxonasa 1

PRC: pobre respuesta a clopidogrel

PRU: unidades de reacción de P2Y₁₂

RI: rango intercuartílico

ROC: Curvas “*Receiver Operating Characteristic*”

SCA: síndrome coronario agudo

SCACEST: síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST

SCASEST: síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST

SNP: polimorfismo de nucleótido simple

TCI: tronco coronario izquierdo

TXA₂: tromboxano A₂

VASP: fosfoproteína estimulada por vasodilatadores

VI: ventrículo izquierdo

wt: (“*wild type*”): genotipo nativo o silvestre

Introducción

1. Introducción.

1.1. Cardiopatía isquémica y Síndrome Coronario Agudo

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en países desarrollados y se calcula que en 2020 también lo serán en los países en vías de desarrollo (1). De igual forma, constituyen la primera causa de mortalidad en España, siendo responsables de 117.484 muertes (53.487 en varones y 63.997 en mujeres) en el año 2013, lo que supone el 30,1% de todas las defunciones (26,8% en varones y 33,6% en mujeres) (2).

Entre las enfermedades cardiovasculares, la cardiopatía isquémica es la más prevalente y es la primera causa de morbi-mortalidad en el mundo. En España, la mortalidad por cardiopatía isquémica ha disminuido de forma suave pero persistente en los últimos 40 años (figura 1, panel A), mientras que el número absoluto de muertes aumentó entre 1980 y 2000 para iniciar después un descenso paulatino (figura 1, panel B) (2,3).

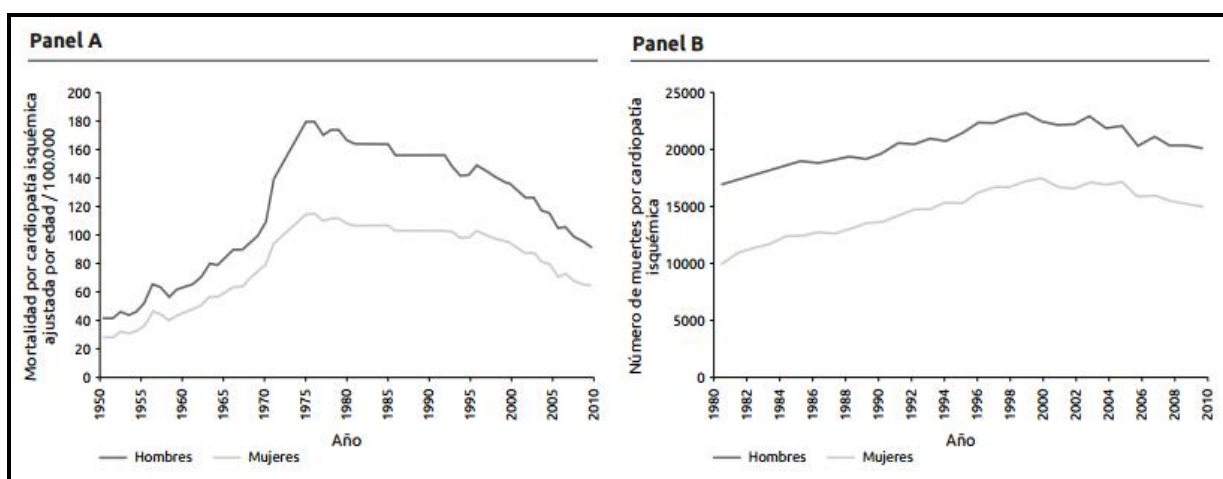


Figura 1. Mortalidad por cardiopatía isquémica en España. Panel A: mortalidad por cardiopatía isquémica estandarizada por edad en el periodo 1950-2010 por sexo. Panel B: Número anual de muertes por cardiopatía isquémica en el periodo 1980-2010 por sexo (3).

La cardiopatía isquémica es un trastorno en el que el miocardio recibe una cantidad insuficiente de sangre y oxígeno, surge de manera específica cuando se produce un desequilibrio transitorio entre la demanda y el aporte de oxígeno (4). La causa más frecuente de isquemia del miocardio es la aterosclerosis de una o varias arterias coronarias, que provoca una disminución de la circulación sanguínea al miocardio y ocasiona una perfusión insuficiente por parte de la arteria coronaria afectada. La cardiopatía isquémica se relaciona con una alimentación con abundantes grasas y carbohidratos, el tabaquismo, la vida sedentaria, la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2 (5).

Las presentaciones clínicas de la cardiopatía isquémica abarcan la isquemia asintomática, la angina de pecho estable, la angina inestable, el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca y la muerte súbita (6).

El Síndrome Coronario Agudo (SCA) es la manifestación clínica más frecuente y letal de la cardiopatía isquémica; incluye un espectro de presentaciones clínicas que engloban a la Angina Inestable, el Infarto de Miocardio sin elevación del segmento ST y el Infarto de Miocardio con elevación del segmento ST, tres manifestaciones de un mismo proceso fisiopatológico: la rotura o la erosión de la placa aterosclerótica que provoca el inicio de las manifestaciones isquémicas, produciendo una trombosis aguda con o sin vasoconstricción concomitante, que causa una reducción brusca y crítica del flujo sanguíneo. El síntoma principal del SCA es la aparición de dolor torácico, aunque la clasificación de los pacientes se basa en el electrocardiograma (ECG) y los marcadores bioquímicos (figura 2):

- SCA con elevación del segmento ST (SCACEST): pacientes con dolor torácico agudo típico y elevación persistente (> 20 minutos) del segmento ST. La mayoría de estos pacientes desarrollará en último término un Infarto Agudo de Miocardio (IAM) con elevación del segmento ST (IAMCEST). El objetivo terapéutico es una reperfusión rápida, completa y sostenida mediante angioplastia primaria o tratamiento fibrinolítico.
- SCA sin elevación del segmento ST (SCASEST): pacientes con dolor torácico agudo pero sin elevación persistente del segmento ST. Se suele presentar una depresión persistente o transitoria del segmento ST, una inversión de las ondas T, ondas T planas, pseudonormalización de las ondas T o ausencia de cambios en el ECG. La estrategia inicial es aliviar la isquemia y los síntomas, monitorizar al paciente con ECG seriados y repetir las determinaciones de los marcadores de necrosis miocárdica que concretará el diagnóstico del SCASEST según el resultado de las troponinas en IAM sin elevación del segmento ST (IAMSEST) o angina inestable.

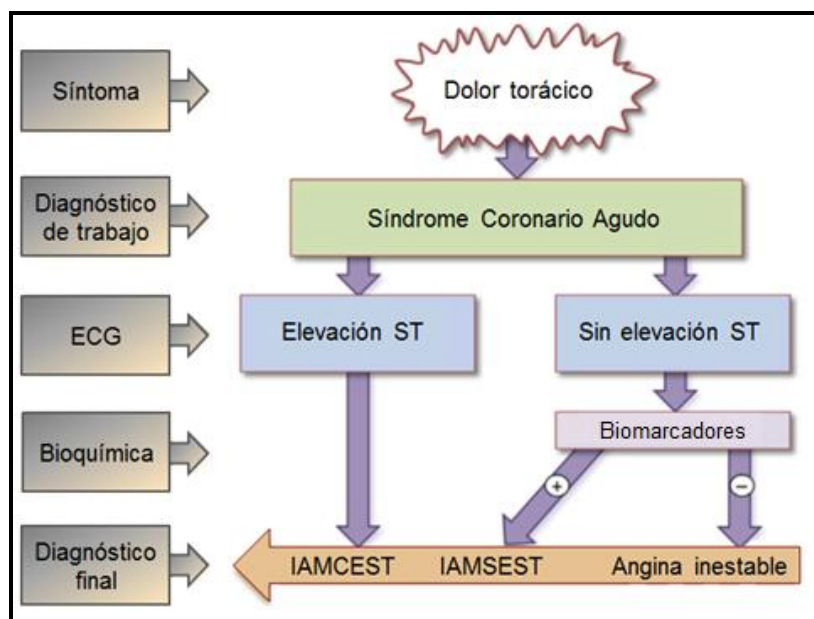


Figura 2. Definición de síndrome coronario agudo.
Adaptación de Hamm et al. (7)

Los estudios previos coinciden en que el SCASEST es más frecuente que el SCACEST (8,9). Asimismo, en el registro internacional GRACE (“*Global Registry of Acute Coronary Events*”) se observó que más del 60% de los pacientes presentaban SCASEST (10,11). No obstante, a pesar de que la mortalidad hospitalaria es más elevada en los pacientes con IAMCEST, en el seguimiento a largo plazo se ha observado que la mortalidad de los pacientes con SCASEST es mayor que en los pacientes con IAMCEST (9).

1.2. Ateroesclerosis.

La aterosclerosis es la formación de placas en forma de parches (ateromas) en la capa íntima de las arterias de mediano y gran tamaño. Estas placas contienen lípidos (colesterol y fosfolípidos intra y extracelulares), células antiinflamatorias (macrófagos, células T), células musculares lisas, tejido conectivo (colágeno, glucosaminoglucanos, fibras elásticas), trombos y depósitos de calcio (12).

Las placas ateroscleróticas pueden ser estables o inestables. Las placas estables involucionan, permanecen estáticas o crecen lentamente durante varias décadas hasta que causen estenosis u oclusión de los vasos. Las placas inestables son vulnerables a la erosión, la fisura o la rotura espontánea, lo que puede ocasionar trombosis, oclusión e infarto bastante tiempo antes de generar estenosis. Las placas que tienen mayor propensión a la inestabilidad tienen un núcleo lipídico grande, baja densidad de células musculares lisas, alta concentración de células inflamatorias y una delgada cápsula fibrosa que recubre el núcleo lipídico, en contraste con las placas estables (12). La mayoría de los eventos clínicos son secundarios a complicaciones de las placas inestables.

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis son la dislipemia, la diabetes, el tabaquismo, los antecedentes familiares, el estilo de vida sedentario, la obesidad y la hipertensión arterial.

La aterosclerosis es la base etiológica de la mayor parte de los episodios cardiovasculares, entre los que se incluye la enfermedad cardíaca coronaria (13). Dentro de la enfermedad arterial coronaria se incluyen dos procesos distintos: un proceso constante y apenas reversible que produce un estrechamiento luminal (aterosclerosis) gradual y lento, y un proceso dinámico y potencialmente reversible que modifica la progresión lenta hacia una forma súbita e impredecible y causa una rápida oclusión coronaria parcial o completa (trombosis, vasoespasmo o ambos). La aterosclerosis predomina en las lesiones que originan la angina estable crónica, mientras que la trombosis es el componente esencial de las lesiones que desencadenan los SCA (14).

Un SCA es una manifestación de la aterosclerosis que pone en riesgo la vida del paciente y normalmente se precipita por la aparición de una trombosis aguda, inducida por la rotura o la erosión de una placa aterosclerótica, con o sin vasoconstricción concomitante que produce una reducción súbita y crítica del flujo sanguíneo. Además de la rotura de la placa, la erosión es otro de los mecanismos subyacentes en los SCA. Cuando ocurre la erosión, el trombo se adhiere a la superficie de la placa, mientras que en los casos de rotura, el trombo afecta a las capas más profundas que se encuentran bajo el núcleo lipídico.

1.3. Aterotrombosis.

La aterotrombosis es un proceso en el que se asocia a la ruptura de la placa de ateroma, la formación de un trombo y es la principal causa de mortalidad y la morbilidad en las sociedades industrializadas en todo el mundo. Se manifiesta clínicamente en forma de enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, o bien por la asociación entre ellas (15).

La activación y la agregación plaquetaria juegan un papel crucial en la generación y la proliferación de un trombo. La activación plaquetaria excesiva después de la ruptura de la placa aterosclerótica o la erosión de las células endoteliales puede conducir a la formación de trombos oclusivos, que bloquean el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno en las arterias afectadas, dando lugar a las manifestaciones clínicas de la enfermedad aterotrombótica. Los trombos pueden ser parcial o completamente oclusivos, los primeros están compuestos principalmente por agregados de plaquetas, mientras que los segundos están compuestos por agregados de plaquetas y un coágulo rico en fibrina (16).

1.4. Fisiología de la plaqueta

1.4.1. Fisiología de la hemostasia

La hemostasia es un proceso complejo que permite la formación de un coágulo en la lesión del vaso sanguíneo. Se distinguen tres etapas en este proceso: hemostasia primaria o formación del tapón plaquetario, hemostasia secundaria o coagulación y fibrinólisis (17).

En condiciones normales, el endotelio vascular contribuye a prevenir la trombosis al inhibir la función plaquetaria, en cambio, cuando es lesionado, activa las plaquetas, favorece la coagulación e inhibe la fibrinólisis.

Las principales funciones de las plaquetas en la hemostasia son la adhesión al endotelio vascular cuando éste sufre una lesión, la activación, la secreción del contenido granular, la agregación con otras plaquetas para la formación del tapón hemostático plaquetario y la aceleración de la coagulación plasmática (18).

La hemostasia primaria comienza cuando se produce una lesión endotelial en la pared vascular. En ese momento, las plaquetas que circulaban en reposo entran en contacto con los elementos del subendotelio, moléculas del factor von Willebrand, de colágeno y de fibronectina, que establecen puentes de fijación con los receptores de la superficie plaquetaria constituyendo el fenómeno de adhesión. Este proceso provoca la activación de las plaquetas y esta información se transmite a través de la vía de las proteínas G acopladas al citoesqueleto, produciendo una serie de cambios bioquímicos y morfológicos como la liberación del contenido granular y la extensión de pseudópodos. En el proceso de liberación, las plaquetas expulsan los productos contenidos en sus gránulos densos [adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), calcio, serotonina] y gránulos alfa (fibrinógeno, fibronectina, plasminógeno, factor von Willebrand, factor activador plaquetario 4); algunos de estos compuestos tienen una intensa actividad estimuladora de la agregación plaquetaria.

La liberación de calcio de los gránulos densos produce un aumento del calcio iónico dentro de la plaqueta que promueve la acción de la fosfolipasa A₂ que genera ácido araquidónico.

El ácido araquidónico en las plaquetas es convertido en tromboxano A₂ (TXA₂) en una reacción catalizada por las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX1) y tromboxano sintetasa. El TXA₂ incrementa la expresión de los receptores de fibrinógeno en la membrana plaquetaria y además es liberado a la circulación uniéndose a sus receptores en las plaquetas adyacentes para desencadenar su activación (19).

La agregación es el proceso por el que otras plaquetas que llegan al sitio vascular afectado se unen a las que están adheridas. Este fenómeno requiere la activación del receptor glucoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), que se mantiene oculto cuando las plaquetas están inactivas y sale al exterior en respuesta a la acción de varios agonistas fisiológicos como ADP, colágeno, trombina, serotonina, TXA₂ y adrenalina. La GP IIb/IIIa es capaz de fijar diferentes glucoproteínas como el fibrinógeno que se une bivalentemente a estos receptores formando los puentes de agregación entre las plaquetas activadas (17).

Las reacciones que se desarrollan cuando se produce una lesión en la pared vascular no sólo conducen a la activación plaquetaria, sino también a una marcada activación de la coagulación. Las vías extrínseca e intrínseca de la coagulación confluyen en la activación del factor X, produciendo la conversión de protrombina en trombina. La trombina desempeña un papel central en la formación del coágulo, ya que es un nexo de unión entre la activación plaquetaria y la activación de la coagulación. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina y promueve su polimerización, dando lugar a una malla en el tapón plaquetario que constituye el coágulo de fibrina definitivo (20,21).

La última etapa de la hemostasia es la fibrinólisis, proceso en el que el coágulo de fibrina es destruido. La lisis del coágulo y la reparación del vaso comienzan inmediatamente

después de la formación del tapón hemostático definitivo. Cuando se han formado los polímeros de fibrina, se inicia la destrucción de esta red que genera los productos de degradación de la fibrina por acción de la plasmina (21).

1.4.2. Importancia del ADP

Entre los múltiples mediadores de la activación plaquetaria, el ADP juega un papel fundamental ya que tras la activación plaquetar, no sólo libera sus gránulos intracelulares sino que también activa aún más las plaquetas amplificando este proceso. En la membrana de las plaquetas, el ADP tiene dos tipos de receptores con un papel específico y complementario en la activación y agregación plaquetaria, son los canales iónicos dependientes de ligando y los receptores acoplados a proteína G, que se denominan P2X₁ y P2Y, respectivamente (16).

El receptor P2X₁ es un canal catiónico en el que el ATP actúa como agonista. Este receptor participa en el cambio morfológico de las plaquetas a través de un flujo de entrada de calcio extracelular y, facilita la amplificación de las respuestas plaquetarias mediadas por otros agonistas.

En cuanto al receptor P2Y, existen dos tipos, P2Y₁ y P2Y₁₂, y ambos utilizan ADP como agonista. La activación de P2Y₁ conduce a una cascada de señalización que produce un cambio transitorio en la forma de las plaquetas, la movilización del calcio intracelular y la liberación de gránulos de otros mediadores para finalmente iniciar una fase débil y transitoria de la agregación plaquetaria. Este receptor está acoplado a dos proteínas: G_q y G₁₂. La proteína G_q y sus vías de señalización intracelular implican la activación de la fosfolipasa C dando como resultado diacilglicerol e inositol trifosfato. El diacilglicerol

activa la proteína quinasa C, provocando la fosforilación de la quinasa de las cadenas ligeras de miosina y la secreción de gránulos; y el inositol trifosfato conduce a la movilización de calcio intracelular. A su vez, la proteína G_{12} activa la proteína “Rho” que se cree que lleva a cabo un cambio en la forma de las plaquetas (16).

Por su parte, la activación del receptor $P2Y_{12}$ inicia una compleja señalización intracelular que conduce a la movilización del calcio, la liberación del contenido de los gránulos, la generación de TXA_2 y la activación del receptor de la GP IIb/IIIa. Todo esto provoca la amplificación de la agregación plaquetaria y la estabilización de los agregados de las plaquetas. El receptor $P2Y_{12}$ está acoplado a una proteína G_i cuyas vías de señalización implican la activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa y la inhibición de la adenilato ciclasa. La activación de la fosfatidilinositol-3-quinasa, a través de la serina/treonina proteína quinasa B y las proteínas de unión a GTP Rap1b, activa la GP IIb/IIIa. La inhibición de la adenilato ciclasa disminuye los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPC), lo que influye en la actividad de las quinasas dependientes de AMPC, que reducen la fosforilación mediada por AMPC de fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) y elimina su efecto protector sobre la activación del receptor GP IIb/IIIa (figura 3) (22).

Cuando las plaquetas son activadas, se libera el ADP que se encuentra en los gránulos plaquetarios. Este ADP actúa como mecanismo de amplificación de las propias plaquetas que lo liberan, así como induciendo y amplificando el reclutamiento plaquetario. La inhibición del efecto agonista del ADP es llevado a cabo por la acción de las tienopiridinas, que son inhibidores no directos e irreversibles del receptor $P2Y_{12}$.

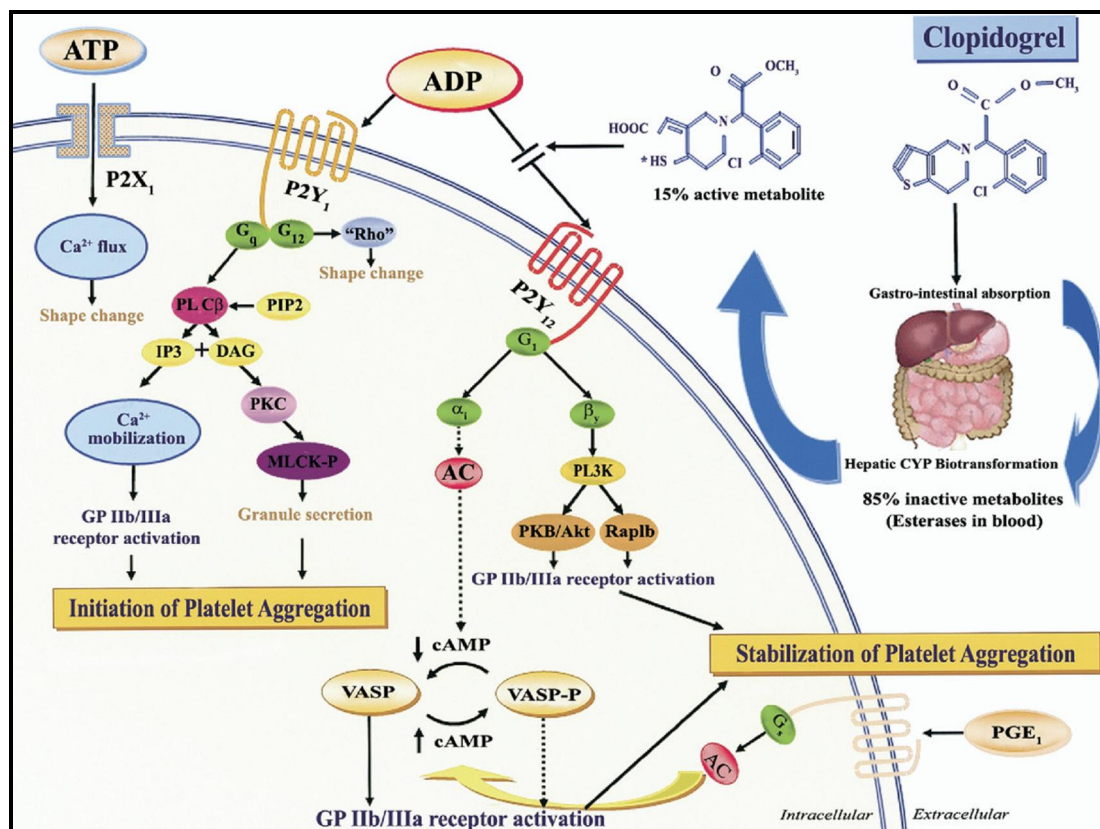


Figura 3. Receptores y mecanismo de acción del clopidogrel (22).

1.5. Clopidogrel

El clopidogrel es una tienopiridina de segunda generación, químicamente relacionada con su predecesor, la ticlopidina (figura 4), pero con menos efectos adversos que ésta, por lo que la ha reemplazado debido a su mejor tolerabilidad y seguridad (20). En el estudio de Moussa et al. (23) se comparó el tratamiento con clopidogrel (300 mg de dosis de carga seguido de 75 mg diarios) frente a ticlopidina (500 mg de dosis de carga seguidos de 250 mg dos veces al día) sin observarse diferencias significativas en la incidencia de eventos cardiovasculares. Sin embargo, se evidenció un menor número de reacciones adversas en el grupo de clopidogrel mientras que los pacientes en tratamiento con ticlopidina presentaron tasas más elevadas de neutropenia, diarrea y rash cutáneo. En estudios posteriores se ha observado una mayor inhibición plaquetaria con clopidogrel que con ticlopidina (24).

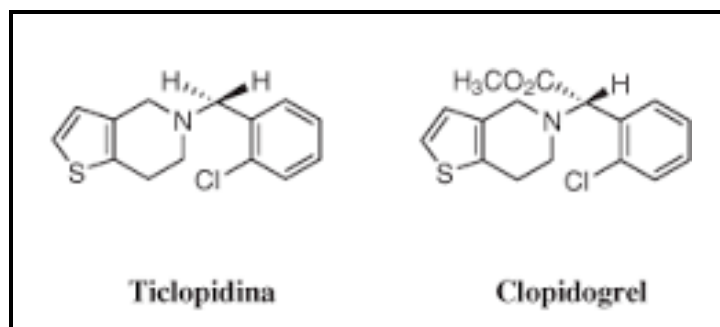


Figura 4. Estructura química ticlopidina y clopidogrel.

1.5.1. Mecanismo de acción

El clopidogrel es un profármaco que requiere biotransformación en su metabolito activo. Este metabolito activo inhibe selectivamente la unión del ADP a su receptor plaquetario P2Y₁₂, y la activación posterior del complejo GP IIb/IIIa mediada por ADP, inhibiendo de esta forma la agregación plaquetaria.

La mayor parte del clopidogrel (85%) se absorbe a nivel intestinal y se transforma en metabolitos inactivos por esterasas intestinales como la carboxilesterasa-1, la carboxilesterasa-2 y la butirilcolinesterasa dando lugar a un derivado de ácido carboxílico inactivo (SR26334). El 15% restante se metaboliza en el hígado por un doble proceso de oxidación en el que intervienen varias isoformas del citocromo P450 (CYP) para convertirse en un metabolito activo. En un primer paso mediado por las isoenzimas CYP1A2, CYP2B6 y CYP2C19 el anillo tiofeno se oxida y se transforma en un metabolito intermedio, 2-oxo-clopidogrel; en un segundo paso, se somete a una oxidación adicional por cuatro isoenzimas del citocromo P450 (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4) y por la enzima paraoxonasa 1 (PON1), en esta segunda oxidación se abre el anillo tiofeno dando lugar a un grupo carboxilo inactivo y un derivado de tiol activo R-130964 (ácido acético 2-[1-[1-(2-clorofenil)-2-metoxi-2-oxoetil]-4-sulfanil-3-piperidinilideno]), que es una tiolactona altamente inestable (figura 5) (25).

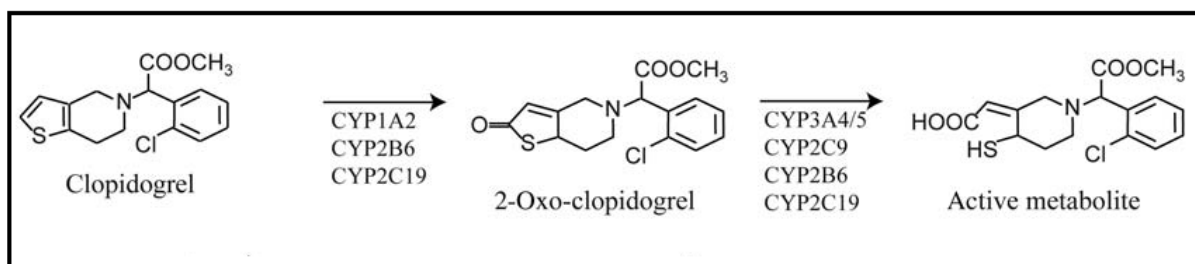


Figura 5. Principal vía que conduce a la formación del metabolito activo del clopidogrel.

El grupo tiol del metabolito activo se une, a través de un puente disulfuro, a dos residuos de cisteína (cys17 y cys270) en los dominios extracelulares del receptor P2Y₁₂, inhibiendo de forma irreversible la unión del ADP a su receptor (22,26). El bloqueo del receptor P2Y₁₂ actúa en la cascada de eventos que conducen a la formación del trombo plaquetario inhibiendo eficazmente la agregación plaquetaria. Esta inhibición evita la degranulación plaquetaria y la liberación de mediadores inflamatorios y protrombóticos.

1.5.2. Posología

Según ficha técnica, el tratamiento con clopidogrel se debe iniciar con una dosis de carga de 300 mg y posteriormente continuar con una dosis de 75 mg una vez al día (27). Con esta dosis de 75 mg diarios de clopidogrel se consigue el mismo grado de inhibición de la agregación plaquetaria que con la dosis de 250 mg dos veces al día de ticlopidina (28,29).

La acción antiagregante de clopidogrel se produce a las pocas horas de una sola dosis, mientras que una inhibición constante y estable se alcanza posteriormente. Por lo general, la agregación plaquetaria y el tiempo de sangría vuelven gradualmente a los valores basales en los 5 días posteriores a la suspensión del tratamiento (27).

Se ha evaluado la utilización de diferentes dosis de clopidogrel. Un aumento en la dosis de mantenimiento podría influir en la agregación plaquetaria, observándose que la administración de 150 mg diarios producía una inhibición de la función plaquetaria más intensa que la dosis recomendada de 75mg (28,30).

El inicio tardío de la acción del clopidogrel requiere el empleo de una dosis de carga para reducir el tiempo necesario para el inicio de acción del fármaco. Con una dosis de carga de 600 mg de clopidogrel se inhibe casi completamente la agregación plaquetaria unas 2 horas, mientras que con una dosis de 300 mg se necesitan entre 24 y 48 horas para obtener el mismo grado de inhibición de la agregación (24). Por este motivo, los pacientes que van a ser tratados con un stent intracoronario deben recibir una dosis de carga de 600 mg o 300 mg, dependiendo de si se administra 2 horas antes o 24 horas del intervencionismo percutáneo (20). Al aumentar la dosis de carga de clopidogrel de 300 mg a 600 mg, se produce un aumento en la inhibición de la agregación plaquetaria y una disminución en la tasa de eventos adversos cardiovasculares, así como un inicio de acción más rápido (31,32).

Asimismo, se ha evaluado la individualización de la dosis de carga (repetidas dosis de 600 mg según la función plaquetar) en pacientes no respondedores objetivándose una disminución en la aparición de eventos adversos cardiovasculares en comparación con una dosis de carga de 600 mg (33), e incluso se ha realizado un metaanálisis comparando las dosis de 300 mg, 450 mg, 600 mg y 900 mg concluyendo que una dosis de carga mayor reduce el riesgo de infarto de miocardio y muerte de origen cardiovascular con tasas similares de hemorragias (34).

1.6. Ácido acetilsalicílico

La aspirina o ácido acetilsalicílico (AAS) es uno de los medicamentos conocidos más antiguos. Presenta propiedades analgésicas, antipiréticas y antiplaquetarias que se conocen desde 1967. Su mecanismo de acción, que fue dilucidado en 1971, consiste en la acetilación de manera irreversible de la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1) de las plaquetas. La COX-1 es responsable de la formación de TXA₂ a partir de ácido araquidónico proveniente de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria. El TXA₂ es uno de los más potentes agonistas de la agregación plaquetaria, activa las plaquetas, participa en su cambio morfológico y en el reclutamiento y agregación de plaquetas circulante al tapón plaquetario (19). La inhibición de la COX-1 disminuye la síntesis de TXA₂ y, como consecuencia, la agregación plaquetaria por lo que previene la formación de trombos (35).

1.7. Doble antiagregación plaquetaria

La inhibición de la COX-1 con ácido acetilsalicílico y del receptor P2Y₁₂ con clopidogrel (figura 6) es la terapia estándar en la mayoría de los pacientes con SCA sometidos o no a intervencionismo coronario percutáneo (ICP) con stent (36).

Las dosis bajas de aspirina reducen la tasa de eventos isquémicos en pacientes de cierto riesgo, aunque no es suficiente en los pacientes de elevado riesgo. Con la doble terapia antiplaquetaria se reduce el número de eventos isquémicos en pacientes con angina inestable, IAMSEST o IAMCEST, así como los sometidos a angioplastia y colocación de stent (37–39).

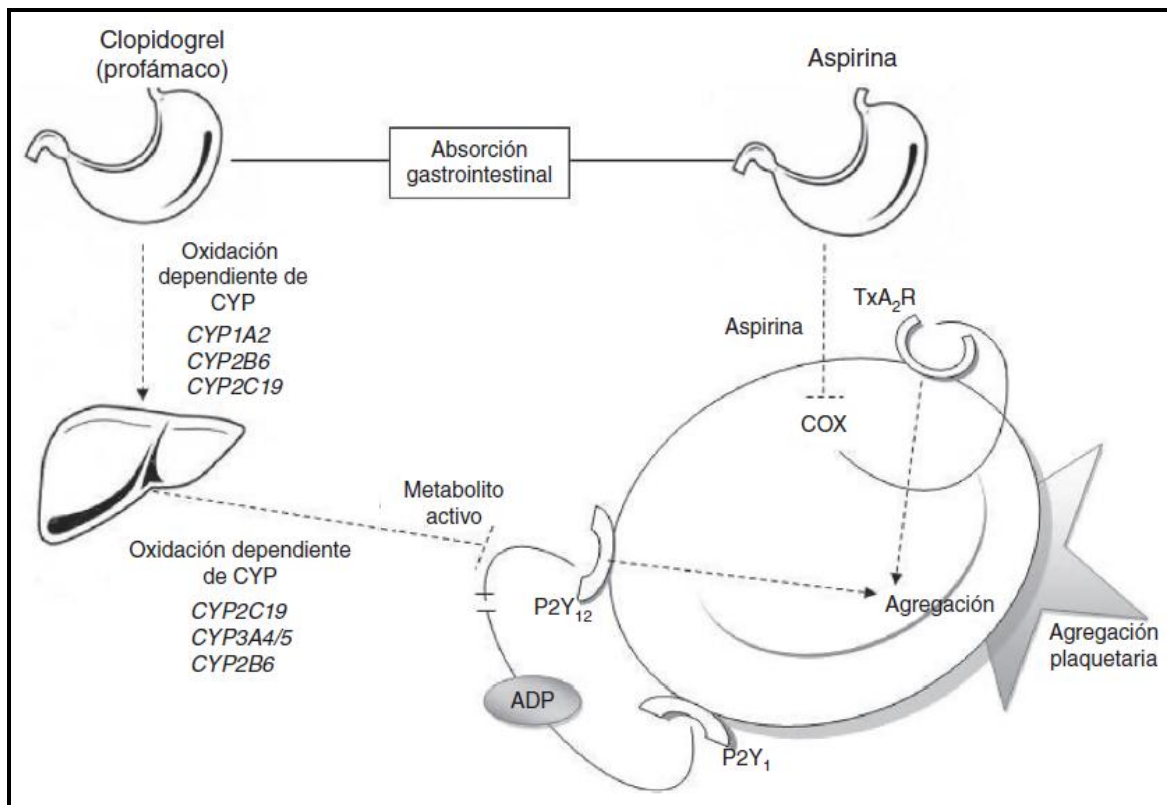


Figura 6. Mecanismo de acción del doble tratamiento antiagregante plaquetario (35).

ADP: adenosín difosfato; COX: ciclooxigenasa, CYP: citocromo P450, TxA₂R: receptor de tromboxano A₂.

El estudio CAPRIE (*Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events*) (40) evaluó la eficacia relativa de clopidogrel (75 mg/día) y de aspirina (325 mg/día) en la disminución del riesgo de IAM, ictus isquémico y muerte vascular en 19.185 pacientes con aterotrombosis. Sus resultados mostraron que el clopidogrel es más efectivo que la aspirina en la prevención de eventos vasculares recurrentes en pacientes con enfermedad vascular aterosclerótica. No obstante, el clopidogrel y la aspirina inhiben la agregación plaquetaria a través de diferentes vías, por lo que el tratamiento combinado proporciona beneficios en comparación con cualquiera de ellos por separado (20).

El primer estudio en demostrar el beneficio del doble tratamiento antiagregante en pacientes con SCA fue el estudio CURE (*Clopidogrel in Unstable angina to prevent*

Recurrent Events”) (41). Este ensayo comparó la eficacia y la seguridad de la doble terapia con aspirina y clopidogrel frente a la aspirina sola en 12.562 pacientes con SCASEST. La variable principal del estudio fue la combinación de muerte de origen cardiovascular, IAM o accidente cerebrovascular. El doble tratamiento antiagregante presentó menos eventos que la aspirina sola (9,3% frente a 11,4%; $p < 0,001$). Sin embargo, el número de complicaciones hemorrágicas fue mayor en el grupo de aspirina y clopidogrel que en el grupo de aspirina sola (3,7% vs 2,7%; $p = 0,001$), aunque sin presentarse diferencias en el número de hemorragias potencialmente fatales entre ambos grupos.

En el estudio CHARISMA (“*the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization Management, and Avoidance*”) (42,43), que se llevó a cabo en 15.603 pacientes con aterotrombosis, se comparó la eficacia y la seguridad de clopidogrel y aspirina frente a placebo y aspirina. No se apreciaron diferencias entre ambos grupos en la variable principal de eficacia que era la aparición de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o muerte de origen cardiovascular; Aunque, sí se observó una reducción en la variable secundaria, definida como la aparición de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, muerte de origen cardiovascular u hospitalización por angina inestable, ataque isquémico transitorio o revascularización, en el grupo tratado con clopidogrel. En cuanto a la seguridad, no se observaron diferencias en el número de hemorragias.

La adición del inhibidor del receptor plaquetario P2Y₁₂, clopidogrel, a la aspirina en los pacientes que se someten a ICP ha reducido drásticamente la tasa de episodios cardiovasculares mayores relacionados con eventos aterotrombóticos en comparación con la aspirina en monoterapia (38,44). A pesar de ello, no todos los pacientes se benefician de igual forma de la doble terapia antiplaquetaria, y algunos continúan sufriendo recurrencias

isquémicas, como la trombosis del stent, lo que aumenta de manera significativa la morbilidad y la mortalidad (38,45).

Numerosos estudios observacionales han demostrado una relación entre los niveles de reactividad plaquetaria y el riesgo de eventos cardiovasculares adversos tras una ICP (46,47). Así, en el estudio EXCELSIOR (*“Impact of Extent of Clopidogrel-Induced Platelet Inhibition During Elective Stent Implantation on Clinical Event Rate”*) (48) en el que se reclutaron 802 pacientes que se sometieron a intervencionismo coronario electivo tras una dosis de carga de 600 mg de clopidogrel, se midió la agregación plaquetaria y se observó que los pacientes con mayor agregación plaquetaria presentaban mayor tasa de eventos cardiovasculares.

1.7.1. Duración de la doble terapia antiagregante

La duración óptima del doble tratamiento antiplaquetario en los pacientes con SCA es objeto de importante controversia e investigación. Las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología recomiendan añadir un inhibidor P2Y₁₂ al ácido acetilsalicílico (AAS) y mantenerlo durante 12 meses en pacientes con SCASEST (6) y en pacientes con IAMCEST que se someten a angioplastia primaria (49).

Sin embargo, otros estudios han observado que una duración de la doble terapia con AAS y clopidogrel igual o superior a 12 meses se asocia con una disminución del riesgo de re-ingresos en pacientes con SCA sometidos a ICP (50,51). El estudio DAPT (*“Dual AntiPlatelet Therapy”*) (51) evaluó la eficacia y seguridad de prolongar el doble tratamiento antiplaquetario más allá de 12 meses en pacientes con stents farmacoactivos. Los pacientes fueron aleatorizados para continuar recibiendo una tienopiridina o para

recibir placebo durante 18 meses. Los pacientes que continuaron con una tienopiridina presentaron una incidencia menor de trombosis del stent y eventos adversos cardiovasculares y cerebrovasculares que los pacientes que recibieron placebo. En cuanto a la seguridad, las tasas de hemorragias moderadas o graves fueron mayores en los pacientes que continuaron el tratamiento con tienopiridinas que en el grupo de placebo. Por el contrario, en el estudio de Park et al. (52) que comparó la continuación de la doble terapia durante más de 12 meses frente al uso de AAS en monoterapia, no encontraron diferencias en la incidencia de infarto de miocardio o muerte de origen cardiovascular en pacientes con stents farmacoactivos.

Por otra parte, algunos autores han valorado una duración más corta de la doble terapia. Los estudios ISAR-SAFE (*“Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Safety And Efficacy of 6 months dual antiplatelet therapy after drug-eluting stenting”*) (53), SECURITY (*“Second generation drug-eluting stent implantation followed by six- versus twelve- month dual antiplatelet therapy”*) (54) y EXCELLENT (*“The Efficacy of Xience/Promus versus Cypher to reduce late loss after stenting”*) (55) evaluaron la no inferioridad de la doble terapia durante 6 meses frente comparada con un tratamiento de 12 meses en pacientes sometidos a ICP. En ninguno de los trabajos se apreciaron diferencias en términos de eficacia o de seguridad entre las dos duraciones del tratamiento (53–55).

En la misma línea, los estudios ITALIC (*“Is There A Life for DES after discontinuation of Clopidogrel”*) (56) y PRODIGY (*“Prolonging Dual Antiplatelet Treatment After Grading Stent-Induced Intimal Hyperplasia Study”*) (57) compararon la doble terapia antiplaquetaria durante 6 meses frente a 24 meses. En el primero, no se encontraron diferencias en la aparición de eventos trombóticos o episodios hemorrágicos, y la duración

de 6 meses mostró no ser inferior a la de 24 meses (56). En el segundo, la duración de 24 meses no fue más efectiva que la de 6 meses en reducir el riesgo de muerte, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. Sin embargo, la terapia prolongada se asoció con un mayor riesgo de eventos hemorrágicos graves (57).

Por último, los estudios OPTIMIZE (“*OPTIMized duration of clopidogrel therapy following treatment with endeavor Zotarolimus-Eluting stent in real-world clinical practice*”) (58,59) y RESET (“*Real Safety and Efficacy of 3-month dual antiplatelet Therapy following Endeavor zotarolimus-eluting stent implantation*”) (60) evaluaron la no inferioridad de acortar el tratamiento a 3 meses frente a la duración convencional de 12 meses en pacientes con enfermedad arterial coronaria (59) y en pacientes con angina o IAM sometidos a ICP (60). Los resultados demostraron la no inferioridad de la terapia de 3 meses en la aparición de eventos cardiovasculares mayores.

1.8. Resistencia al tratamiento

A pesar del beneficio del tratamiento antiagregante, se ha observado que la reactividad plaquetaria es variable y que los pacientes no responden de manera uniforme a esta terapia (35), es decir, un gran número de pacientes presenta una inhibición plaquetaria incompleta (61,62) y, es conocido que, una elevada reactividad plaquetar a pesar del tratamiento, también llamada pobre respuesta a clopidogrel (PRC), se asocia con mayor riesgo de complicaciones isquémicas y un pronóstico más desfavorable (63–65).

Se define resistencia o falta de respuesta como una inhibición plaquetaria inadecuada a pesar de un correcto tratamiento antiagregante, es decir, cuando tras realizar test

bioquímicos funcionales se comprueba que la agregación plaquetaria no ha sido inhibida por el tratamiento antiagregante. Por su parte, se define resistencia clínica o fallo del tratamiento como la ocurrencia de un evento cardiovascular a pesar de una correcta administración y una correcta adherencia al fármaco (35,66).

A pesar de recibir un tratamiento adecuado con una dosis de carga de clopidogrel de 300 mg seguido de una dosis de mantenimiento de 75 mg diarios, la PRC es un fenómeno relativamente frecuente con una incidencia que varía entre el 5 y el 70% de los pacientes (36,46,47,67–74). Este porcentaje difiere mucho entre unos estudios y otros debido a que no existe un consenso sobre la prueba para medir la función plaquetaria ni el punto de corte a utilizar para definir al paciente pobre respondedor. Existen múltiples estudios que han asociado la respuesta disminuida a clopidogrel con un aumento del riesgo de presentar eventos cardiovasculares como trombosis del stent, eventos isquémicos, infarto de miocardio periangioplastia o incluso la muerte (46–48,75–77).

Una respuesta a clopidogrel disminuida, medida como una elevada reactividad plaquetaria a pesar de tratamiento se asocia con un aumento en el riesgo de infarto peri-angioplastia. En el estudio de Ko et al. se observó que la PRC era un factor predictor de infarto peri-angioplastia y eventos adversos cardiovasculares graves (63). Estos datos son comparables con otros estudios en los que se ha observado una incidencia de infarto de miocardio periprocedimiento superior en los pacientes con elevada reactividad plaquetar (71,78).

Algunos investigadores sugieren que podría existir una ventana terapéutica (figura 7) para la inhibición plaquetaria por los antagonistas del receptor P2Y₁₂ (79,80), lo que indica que

una elevada reactividad plaquetar se asocia con eventos trombóticos mientras que una baja reactividad plaquetar puede estar relacionada con eventos hemorrágicos (76,81–83).

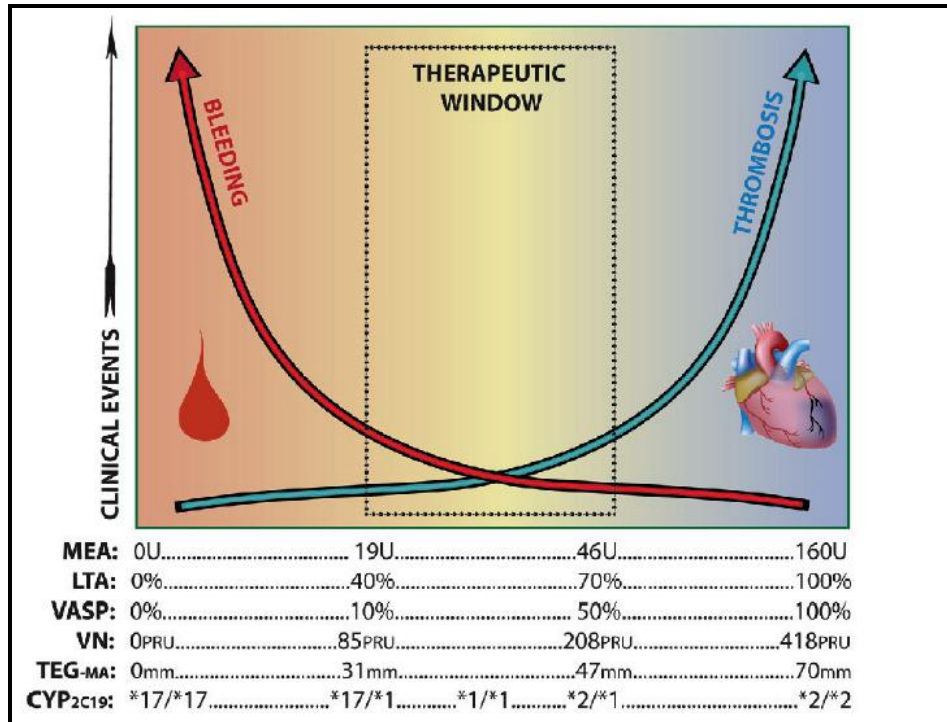


Figura 7. Modelo que sugiere una ventana terapéutica para los inhibidores del receptor P2Y₁₂ (79). CYP: citocromo P450, LTA: agregometría de transmisión óptica, MEA: agregometría de electrodo múltiple, TEG-_{MA}: amplitud máxima en tromboelastografía, VASP: fosfoproteína estimulada por vasodilatación, VN: VerifyNow P2Y₁₂.

1.8.1. Factores que influyen en la variabilidad de la respuesta

Los mecanismos que conducen a una PRC no son del todo bien conocidos y son probablemente de origen multifactorial. Entre las causas que pueden contribuir a la PRC se encuentra la variabilidad interindividual muy en relación con los polimorfismos genéticos, la medicación concomitante, la falta de adherencia al tratamiento, la dosificación inapropiada, las interacciones farmacológicas, la dieta, la obesidad, el tabaquismo, la ingesta de alcohol, la presencia de comorbilidades como la diabetes mellitus y la resistencia a la insulina (84–90). Estos factores han sido clasificados por Angiolillo et al. (91) en clínicos, celulares y genéticos (figura 8).

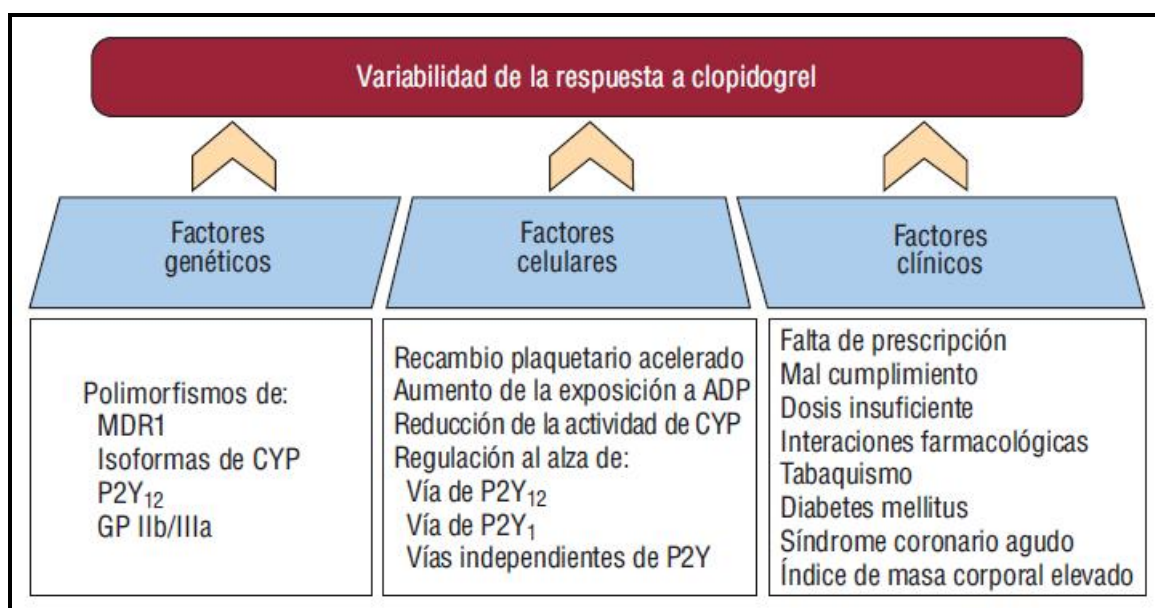


Figura 8. Mecanismos involucrados en la variabilidad de la respuesta a clopidogrel (91).
 ADP: adenosina difosfato, CYP: citocromo P450, GP IIb/IIIa: glucoproteína IIb/IIIa, MDR: transportador de resistencia a múltiples fármacos

1.8.1.1. Factores clínicos

Entre los factores clínicos asociados a una respuesta insuficiente al clopidogrel, el cumplimiento terapéutico es uno de los más importantes. Una mala adherencia al clopidogrel se asocia con peores resultados adversos. Sin embargo, este factor no es suficiente para explicar la variabilidad individual y las complicaciones trombóticas que aparecen con el tratamiento (92). La dosis de carga de clopidogrel también se relaciona con la respuesta. La prevalencia de pobre respondedores es menor en los estudios que utilizan una dosis de clopidogrel de 600 mg en comparación con los estudios con una dosis de carga de 300 mg (93).

La variabilidad en la respuesta a clopidogrel se relaciona con el diagnóstico del paciente, de modo que, los pacientes con SCA presentan una mayor reactividad plaquetar a pesar de tratamiento, es decir, responden peor que los pacientes con enfermedad coronaria estable

(76). También se ha observado que los pacientes con SCA presentan mayor riesgo de sufrir trombosis del stent (94).

Entre las características clínicas que pueden afectar a la reactividad plaquetaria y, por tanto, a la respuesta a clopidogrel se encuentran la presencia de diabetes mellitus o la obesidad. Se ha observado que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan una menor inhibición plaquetaria tras el tratamiento con clopidogrel en comparación con los pacientes no diabéticos (86,95), también se ha advertido que dentro de los pacientes diabéticos, los pacientes insulino-dependientes presentan mayor agregación plaquetaria a pesar del tratamiento que los no insulino-dependientes (95). En cuanto a la obesidad, los estudios previos muestran que los pacientes con un valor más elevado de índice de masa corporal (IMC) presentan una mayor agregación plaquetaria tras la administración de clopidogrel que aquellos con un IMC normal (96). En este mismo sentido, en un estudio que comparó las características basales de pacientes pobre-respondedores y normo-respondedores a clopidogrel, los primeros presentaron un valor de IMC significativamente superior (97). Algunos autores sugieren que podría ser necesario dosificar el clopidogrel en función del peso (98).

Las interacciones farmacológicas son otro de los motivos de resistencia al disminuir la biotransformación del clopidogrel en su metabolito activo. Esto se debe a que el citocromo P450 es el responsable del metabolismo de numerosos fármacos y sustancias que podrían interferir en el metabolismo del clopidogrel (figura 9).

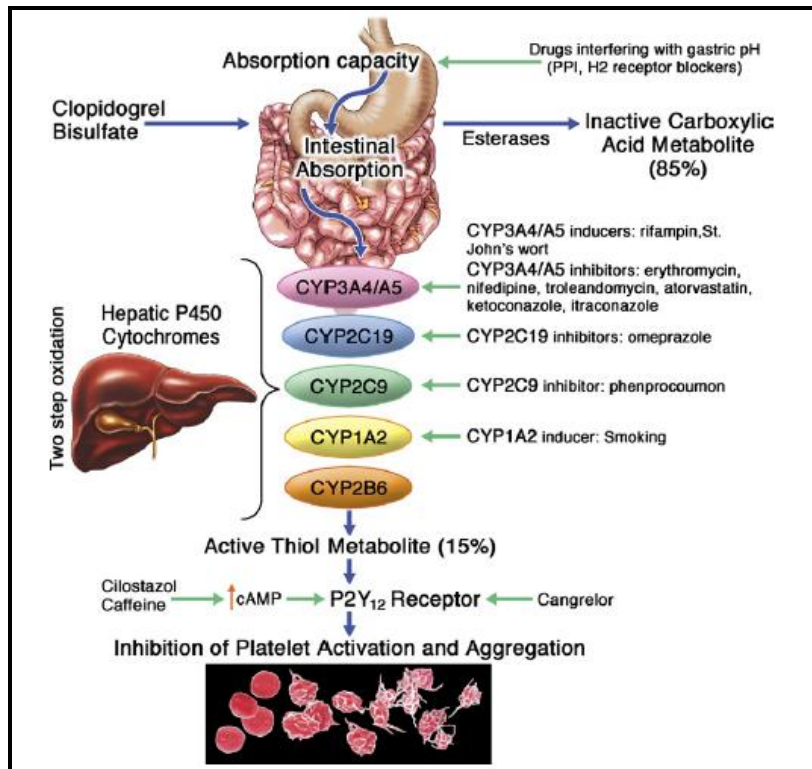


Figura 9. Interacciones farmacodinámicas que influyen en los niveles de metabolito activo (99). cAMP: adenosín monofosfato cíclico, CYP: citocromo P450, PPI (*proton pump inhibitors*): inhibidores de la bomba de protones.

Las estatinas lipófilas (atorvastatina, lovastatina y simvastatina) son sustratos del citocromo P450, principalmente de CYP3A4, isoenzima que también participa en la activación de clopidogrel. Se ha observado que la acción de clopidogrel se ve atenuada en presencia de atorvastatina y esta atenuación aumenta cuando mayor es la dosis de atorvastatina. Sin embargo, la inhibición de la agregación plaquetaria no se modifica cuando el clopidogrel se administra junto con pravastatina ya que ésta no es metabolizada por el CYP3A4. Este estudio llegó a la conclusión de que la atorvastatina, a las dosis administradas rutinariamente a los pacientes, inhibe la actividad de CYP3A4 de forma dosis-dependiente, y por lo tanto disminuye la transformación de clopidogrel en su metabolito activo (100). No obstante, algunos estudios no respaldan esta afirmación (101).

Asimismo, se ha observado que el clopidogrel era menos activo cuando se administraba de forma concomitante con eritromicina, que es un inhibidor del CYP3A4 y en cambio, su actividad aumentaba en presencia de rifampicina, inductor de CYP3A4 (100,102). Otros fármacos inhibidores del CYP3A son el ketoconazol y el itraconazol. La inhibición del CYP3A disminuye la formación del metabolito activo de clopidogrel, lo que se asocia con una menor inhibición de la agregación plaquetaria (103,104).

Los inhibidores de la bomba de protones (IBP) se recomiendan en pacientes en tratamiento con el doble tratamiento antiplaquetario con el fin de reducir el riesgo de hemorragia gastrointestinal. Sin embargo, varios estudios muestran que la asociación de clopidogrel con los IBP reduce de forma significativa la inhibición de la agregación plaquetaria de clopidogrel y la biodisponibilidad de su metabolito activo (87,101,105). Esto puede conducir a un mayor riesgo de eventos adversos cardiovasculares mayores mediante la alteración de la farmacocinética de clopidogrel. Esta interacción se debe a un efecto competitivo de los IBP, especialmente de omeprazol y lansoprazol, sobre el CYP2C19, isoenzima que participa en la bioactivación del clopidogrel (101). En el estudio OCLA (“*Omeprazole Clopidogrel Aspirin*”) (105) realizado en pacientes sometidos a ICP en tratamiento con clopidogrel se comparó la reactividad plaquetaria en pacientes tratados con omeprazol y con placebo. Los pacientes del grupo de omeprazol presentaron valores más elevados de reactividad plaquetaria que los de placebo. Asimismo, el porcentaje de pacientes pobre respondedores en el grupo de omeprazol fue más del doble que en el grupo de placebo. En el estudio de Burkard et al. (87), que evaluó los resultados adversos en pacientes sometidos a ICP, se observó que los pacientes tratados con clopidogrel junto con IBP presentaban mayor tasa de eventos cardiovasculares mayores e IAM que los pacientes sin IBP. Por el contrario, en el estudio aleatorizado doble-ciego COGENT (“*Clopidogrel*

and the Optimization of Gastrointestinal Events”), que incluyó 3761 pacientes con enfermedad arterial coronaria, se evaluó la eficacia y seguridad de la combinación de clopidogrel con omeprazol frente a clopidogrel con placebo. Sus resultados muestran que los pacientes en tratamiento con omeprazol presentaban menos eventos gastrointestinales sin observarse diferencias en los eventos cardiovasculares entre los pacientes con y sin omeprazol (106,107).

La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios publicó en 2009 una nota informativa sobre la posible interacción entre el clopidogrel y los IBP, en la que se desaconseja el uso concomitante de clopidogrel con omeprazol o esomeprazol, excepto cuando se considere estrictamente necesario para prevenir el riesgo de hemorragia digestiva alta, para lo cual deberá realizarse una evaluación individualizada del balance beneficio/riesgo para cada paciente (108,109). Esto ha conducido a una disminución en la prescripción de IBP asociados a clopidogrel, especialmente omeprazol aunque también pantoprazol (110).

Los antagonistas de los canales de calcio inhiben el CYP3A4, por lo que su uso concomitante con clopidogrel puede reducir la conversión de éste en su metabolito activo, atenuando la inhibición plaquetaria. Se ha observado que los pacientes que utilizan antagonistas de los canales calcio junto con clopidogrel presentan valores más elevados de reactividad plaquetaria (111–113) y mayor riesgo de sufrir eventos cardiovasculares adversos (112) que los pacientes en tratamiento solo con clopidogrel.

Las interacciones de clopidogrel no son sólo farmacológicas sino que también se producen con el tabaco o con la hierba de San Juan. El hábito tabáquico también se relaciona con la

variabilidad interindividual en la respuesta a clopidogrel ya que el tabaco es un potente inductor de la isoforma CYP1A2, por lo que puede aumentar la biotransformación del clopidogrel. Algunos estudios han evidenciado que los fumadores activos presentan cifras inferiores de reactividad plaquetar que los no fumadores y por tanto, una mayor inhibición de la agregación plaquetaria; y este efecto es más pronunciado en los pacientes que fuman más de 10 cigarrillos al día (114,115). El hábito tabáquico parece modificar el efecto beneficioso de clopidogrel tanto en los resultados angiográficos como en los clínicos (116).

Por su parte, la hierba de San Juan es un inductor del CYP2C19 y del CYP3A4 que aumenta la respuesta farmacodinámica del clopidogrel y disminuye la agregación plaquetaria (117).

1.8.1.2. Factores celulares

Los factores celulares también pueden contribuir a la variabilidad en la respuesta a clopidogrel. Un posible mecanismo es un recambio plaquetario acelerado, que produce una mayor población de plaquetas jóvenes que son más reactivas que las plaquetas más antiguas. El recambio plaquetario está representado por la presencia de plaquetas reticuladas, que son las formas más jóvenes de las plaquetas circulantes, que podrían tener una mayor reactividad y, por tanto, empeorar la respuesta a clopidogrel (91). Esta relación se ha observado en el estudio de Cesari et al. (118) llevado a cabo en 372 pacientes con SCA, en el que los pacientes con elevada reactividad plaquetaria presentaron un porcentaje más elevado de plaquetas reticuladas. Estos resultados están en consonancia con los del estudio de Guthikonda et al. (119) en pacientes con enfermedad arterial coronaria estable.

1.8.1.3. Factores genéticos

Los polimorfismos de los genes involucrados en la absorción, distribución, metabolismo, excreción de clopidogrel y los relacionados con el receptor P2Y₁₂ contribuyen a explicar alrededor de un 20% de la variabilidad interindividual (82).

1.9. Farmacogenética.

Uno de los principales problemas de la farmacología es la gran variabilidad interindividual que aparece en la respuesta a los fármacos. La administración de un mismo medicamento a distintos sujetos a las dosis recomendadas produce diferentes respuestas, resultando eficaz en la mayoría de ellos pero no en todos (120).

A principios del siglo XX (1902-1909), el médico Sir Archibald Garrod introdujo el concepto de “*chemical individuality*” para describir la toxicidad de ciertos individuos con una dosis de fármaco que era inocua para la mayoría (121,122). Garrod propuso que los medicamentos sufrían una biotransformación por vías metabólicas específicas, de manera similar a los sustratos endógenos, y que los defectos en estos procesos bioquímicos, determinados genéticamente, podían ser la causa de las reacciones adversas de los fármacos (123). En 1957, Arno Motulsky propuso que la eficacia de los fármacos y la presencia de reacciones adversas a los medicamentos podría explicarse por variaciones individuales determinadas genéticamente (124). Dos años más tarde, en 1959, Fredrich Vogel acuñó el término farmacogenética para designar el estudio del papel que juega la variación de los genes individuales en la respuesta a los medicamentos (125,126). Poco tiempo después, en 1962, Werner Kalow sentó las bases de la Farmacogenética como ciencia en su monografía “*Pharmacogenetics: Heredity and Response to Drugs*” (127).

En la actualidad, la farmacogenética se define como la disciplina orientada al estudio de los aspectos genéticos relacionados con la variabilidad en la respuesta de los pacientes a un fármaco (121). Aunque generalmente se ocupa de los genes relacionados con el metabolismo de los fármacos, se extiende a todos los factores involucrados en la farmacocinética y farmacodinamia del fármaco (transportadores, receptores, enzimas, canales iónicos, etc.) (120).

La secuenciación del genoma humano ha demostrado que el 99,9% del ADN (ácido desoxirribonucleico) es prácticamente idéntico en todos los individuos, y la diferencia se debe a variaciones genéticas como el tamaño de las secuencias repetidas, deleciones, inversiones y, sobre todo, cambios en un solo par de nucleótidos denominados polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Por definición, un polimorfismo es una variante genética por la que se presentan varios alelos de un gen en una población, que pueden expresarse como diferentes fenotipos, y que aparecen con una frecuencia de al menos el 1% en una población (128), es decir, es una variación en un lugar determinado de la secuencia de ADN entre los individuos de una población. Las variaciones genéticas más importantes son (figura 10) (121):

- Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) son los más frecuentes constituyendo hasta el 90% de todas las variaciones genómicas. Son variaciones que sólo afectan a un par de bases de la secuencia de ADN [adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T)] entre miembros de una misma especie y se asocian con determinadas enfermedades y con distintas respuestas ante un mismo fármaco. Los SNP se pueden clasificar en sinónimos cuando la sustitución en un par de bases dentro de un codón no modifica el aminoácido codificado, y no sinónimos cuando

la variación provoca la sustitución del aminoácido. Dicho cambio puede modificar la estructura y la estabilidad de la proteína, su afinidad al sustrato o introducir un codón de terminación. Se pueden clasificar también en funcionales cuando alteran la expresión del gen o la función de la proteína y no funcionales cuando no tienen ningún efecto.

- Las inserciones o deleciones (INDEL) de entre 1 y 30 pares de bases son el segundo tipo de polimorfismo más frecuente y, dentro de este grupo, lo más común es que afecte a un solo nucleótido (129). Cuando se encuentran en regiones codificantes pueden causar disrupciones de la secuencia de lectura o, si ocurre en regiones promotoras, pueden alterar la transcripción del gen.
- Las variaciones en número de copias (CNV) afectan a grandes regiones del genoma que pueden estar duplicadas o suprimidas. No se limitan a regiones dentro del gen, sino que pueden comprender toda la secuencia de uno o incluso varios genes o fragmentos cromosómicos.

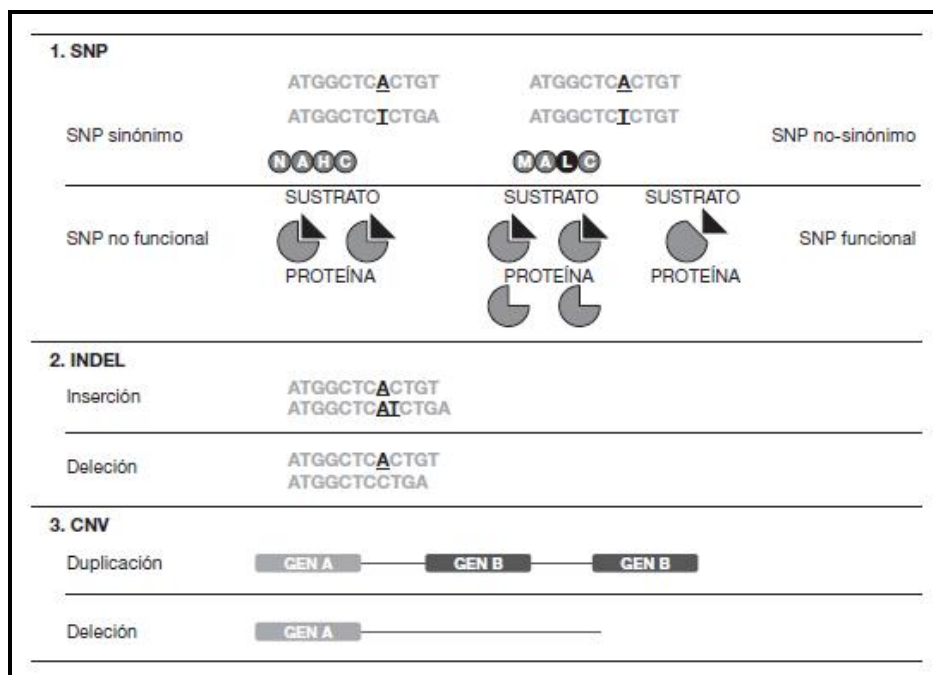


Figura 10. Tipos de variaciones genéticas (121).

Durante el proceso de absorción, metabolismo, transporte y excreción de un fármaco intervienen numerosas proteínas. La síntesis de estas proteínas viene determinada por los genes, es decir, por la secuencia de bases del ADN, por lo que una pequeña variación en la secuencia del gen que codifica una de estas proteínas puede originar una proteína distinta que, al interactuar con el fármaco, provocará una respuesta diferente (130). Esta heterogeneidad en la respuesta a los fármacos es el resultado de factores individuales del paciente (genéticos y ambientales) y propios de la enfermedad. En este sentido, se admite que los factores genéticos son responsables del 20-40% de las diferencias interindividuales en la respuesta a los medicamentos (123).

La farmacogenética debe ser considerada como uno de los pilares de la medicina personalizada, pues permite, en una población específica, relacionar aspectos genéticos con la buena o mala respuesta del paciente a una determinada medicación, es decir, conocer qué fármacos pueden ser destinados a grupos específicos de pacientes definidos genéticamente. También pretende medir qué medicamentos ofrecen mayor beneficio terapéutico o menor riesgo de desarrollar una reacción adversa (120). Conociendo cómo afecta un determinado polimorfismo genético al metabolismo y a la acción de los medicamentos, es posible predecir para cada paciente qué medicamento es el que ofrece mayor beneficio terapéutico y qué probabilidad existe de desarrollar una reacción adversa en función de su dotación genética.

1.10. Farmacogenética del clopidogrel.

El clopidogrel es un profármaco que requiere su bioactivación antes de inhibir la función plaquetaria, por lo que la variación en la actividad enzimática puede influir en el efecto

terapéutico (131). El clopidogrel tiene una biodisponibilidad oral del 50% (132) y una insuficiente biodisponibilidad del metabolito activo de clopidogrel a dosis terapéuticas conlleva una inactivación incompleta del receptor plaquetario P2Y₁₂.

El proceso de activación del clopidogrel tiene dos etapas, el primer paso es el de mayor importancia clínica, ya que determina la cantidad de clopidogrel que entra en la vía de la activación. La contribución de cada enzima en el primer paso de la bioactivación es 35,8% para CYP1A2, 19,4% para CYP2B6 y 44,9% para CYP2C19. En el segundo paso la contribución es 39,8% para CYP3A4, 6,8% para CYP2C9, 32,9% para CYP2B6 y 20,6% para CYP2C19 (133). Las variaciones genéticas de las enzimas hepáticas responsables del metabolismo de clopidogrel son importantes factores de los distintos niveles circulantes de su metabolito activo. Por tanto, no es de extrañar que los polimorfismos en estos genes se asocien con variaciones en la inhibición plaquetaria y en la respuesta clínica al tratamiento con clopidogrel.

1.10.1. Citocromo P450

El sistema del citocromo P450 está compuesto por una familia de hemoproteínas involucradas en cadenas de transporte de electrones, que se encuentran predominantemente en el hígado y que son responsables del metabolismo oxidativo de un gran número de fármacos. La familia del citocromo P450 comprende 57 genes que son altamente polimórficos, con varios alelos que confieren una función alterada de la proteína en la población. Las variantes genéticas pueden dar lugar a una serie de efectos: toxicidad debido a la acumulación del fármaco como resultado de un déficit en el metabolismo, falta de activación de un profármaco o metabolismo ultrarrápido con la consecuente falta de efecto terapéutico (128).

De acuerdo con los cambios funcionales en la proteína codificada encontraremos distintos fenotipos en la población, la mayoría de los individuos tienen una actividad enzimática normal (metabolizadores eficientes o extensivos), aunque también existen metabolizadores lentos, intermedios y ultrarrápidos. De éstos, los primeros son aquellos que poseen dos alelos con ausencia total de actividad metabólica, los intermedios son portadores de un alelo funcional y otro no funcional o dos alelos parcialmente funcionales mientras que los ultrarrápidos poseen múltiples copias del gen funcional (134). Las consecuencias para los individuos portadores de estos polimorfismos genéticos pueden ir desde la ausencia de actividad farmacológica hasta la toxicidad severa (125).

Sin embargo, el impacto de estas variantes depende de si los fármacos se transforman en metabolitos activos o inactivos. Si el fármaco se transforma en un metabolito activo, el efecto del mismo será mayor en los individuos metabolizadores lentos y mucho menor en los ultrarrápidos. Por el contrario, si se trata de un profármaco que se metaboliza en su forma activa, los metabolizadores lentos no tendrán el efecto y los ultrarrápidos podrían presentar efectos adversos. El clopidogrel es un profármaco que se activa a través de enzimas polimórficas; por esta razón, los metabolizadores muy lentos podrían beneficiarse de un tratamiento alternativo, los intermedios podrían recibir unas dosis un poco más altas que las de la población y los metabolizadores ultrarrápidos dosis más bajas que la media (135).

El sistema de nomenclatura y clasificación del citocromo P450, identifica a las enzimas con las siglas CYP seguidas de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que se corresponde con el gen. En una misma familia se

agrupan aquellos enzimas cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud mayor del 40%, y dentro de una familia, se agrupan en subfamilias que se denominan correlativamente empezando siempre por la letra A. El requisito para pertenecer a la misma subfamilia es que tengan una homología en la secuencia de aminoácidos superior al 55%. Por último, dentro de una misma subfamilia, los enzimas individuales se designan empezando siempre por el número 1 y se consideran diferentes siempre y cuando sus respectivas secuencias difieran en más de un 3%. La secuencia de referencia conocida como genotipo salvaje o “*wild type*”, es la que representa la funcionalidad normal de la proteína y suele coincidir con la de mayor frecuencia. La secuencia de tipo salvaje se designa con el nombre del gen seguido de un asterisco y el número 1. Todas las variaciones de la secuencia se nombran con un asterisco seguido de un número correlativo (136).

1.10.1.1. CYP2C9

La subfamilia 2C contiene más de 10 genes, de los cuales, CYP2C9 y CYP2C19 participan en el metabolismo de clopidogrel. CYP2C9 se expresa predominantemente en el hígado, representa aproximadamente el 20% del contenido hepático y está involucrado en el metabolismo del 10 - 15% de las drogas o fármacos habituales (134).

Para el gen de CYP2C9, se han descrito más de 30 SNPs diferentes en la región reguladora y de codificación, aunque su comportamiento polimórfico está principalmente representado por sus dos variantes más frecuentes: CYP2C9*2 y CYP2C9*3 (137); una sustitución de una citosina por una timina en la posición 430 (430C>T) y sustitución de una adenina por una citosina en la posición 1075 (1075A>C), respectivamente. Ambos polimorfismos producen una disminución de la actividad de CYP2C9 como consecuencia de una

sustitución de un aminoácido en la enzima (138). Su frecuencia difiere entre diferentes grupos étnicos; la variante *2 se presenta principalmente en la población caucásica (139), mientras que su frecuencia en africanos y asiáticos es mucho menor (140). Por su parte, la variante *3 es menos común, con una frecuencia inferior al 10% en caucásicos y asiáticos, y no se presenta en la población africana (139).

1.10.1.2. CYP2C19

Los polimorfismos en este gen afectan al metabolismo de muchos fármacos así como a la activación de profármacos como el clopidogrel, ya que el citocromo P450 2C19 participa en los dos pasos de transformación de clopidogrel en su metabolito activo. La presencia de un alelo de pérdida de función no es un fenómeno infrecuente, aproximadamente un tercio de la población caucásica y dos tercios de la población asiática, son portadores de al menos un alelo de pérdida de función (62,67,141–143).

Concretamente, el polimorfismo más común es el CYP2C19*2 (138,144,145), que es responsable del fenotipo de metabolismo disminuido y se relaciona con una disminución de la actividad enzimática y, por tanto, de la efectividad del clopidogrel. Este polimorfismo tiene una frecuencia del 15% en caucásicos y del 30-35% en asiáticos (139). Otras variantes alélicas causantes de la reducción o ausencia de la actividad enzimática son *3, *4, *5, *6, *7 y *8 (146,147) aunque presentan una frecuencia inferior al 1% (148), a excepción del polimorfismo CYP2C19*3 (149) en población asiática que aparece en torno al 3-9% (67,140,147).

El polimorfismo CYP2C19*2 consiste en una sustitución de una guanina por una adenina en la posición 681 del exón 5 que resulta en un *splicing* aberrante (681G>A) y el

CYP2C19*3 es una sustitución de una guanina por una adenina en la posición 636 del exón 4 (636G>A) que provoca un codón “stop” prematuro (150).

Numerosos estudios han observado que los pacientes portadores del polimorfismo CYP2C19*2 presentan valores más elevados de reactividad plaquetar que los no portadores (64,142–145,148,150), así como mayor riesgo de sufrir eventos adversos cardiovasculares como se ha puesto de manifiesto en el metaanálisis realizado por Mega et al. (151) que incluyó 9 estudios con 9685 pacientes tratados con clopidogrel y, predominantemente con ICP.

Por su parte, la variante CYP2C19*17 es responsable del incremento de la transcripción de CYP2C19, causando un aumento de la actividad, es decir, es responsable del fenotipo de metabolizador ultrarrápido. Este polimorfismo es una sustitución de citosina por timina en la posición -806 de la región del promotor (-806C>T) que aparece con una frecuencia de alrededor del 20% en caucásicos y afroamericanos, siendo menos común en la población asiática (146). El CYP2C19*17 que actúa como alelo de ganancia de función, se relaciona con tasas de eventos aterotrombóticos inferiores pero también con un aumento del riesgo de hemorragia (82,152–154).

La herencia es codominante por lo que los portadores heterocigotos de estas variantes presentan la mitad de la actividad que los portadores homocigotos. De este modo, las variantes alélicas de CYP2C19 pueden dar lugar a los siguientes fenotipos: metabolizador ultrarrápido (*17/*17), rápido (*1/*17), extensivo (*1/*1), intermedio (*1/*2, *1/*3, *2/*17, *3/*17) y pobre (*2/*2, *3/*3, *2/*3). Se ha observado una buena correlación

entre estos fenotipos y los valores de reactividad plaquetaria mediante pruebas de función plaquetaria (62,146,155).

1.10.1.3. CYP3A4

La importancia de la familia 3 reside en que participa aproximadamente en la biotransformación de entre el 45-60% de los fármacos, a través de su miembro más representativo, el CYP3A4, que en el hígado representa el 30% del contenido total de citocromos. Interviene en el metabolismo de un amplio rango de xenobióticos, así como del 50% de los fármacos utilizados actualmente que sufren metabolismo oxidativo (156).

Para el gen CYP3A4 se han descrito más de 20 variantes, algunas de ellas con una disminución de la actividad (*6,*17 y *20) aunque se presentan una frecuencia tan baja que se descarta su papel en la variabilidad interindividual (134). Otro polimorfismo que se ha relacionado con una actividad significativamente menor es CYP3A4*1B, que explica en cierta parte la base genética de la variación interindividual en la expresión de CYP3A4. El polimorfismo CYP3A4*1B está localizado en la región promotora del gen y consiste en una sustitución de adenina por guanina en la posición -392 del promotor (-392A>G) (157).

Se ha observado una prevalencia del polimorfismo CYP3A4*1B de un 3% en una población homogénea de pacientes caucásicos del centro de España (157), sin embargo, es mucho más prevalente en población de etnia afroamericana (158).

Hasta la fecha, se han realizado pocos estudios (90,138,149,157,159–161) que evalúen una potencial asociación entre el polimorfismo *1B del CYP3A4 y la respuesta a clopidogrel. Estos estudios (90,138,149,157,159,161) se han realizado en sanos (161), en pacientes con

enfermedad coronaria estable (157), remitidos para intervencionismo coronario electivo (138,159), pacientes con antecedentes de trombosis de stent (149) o poblaciones mixtas de enfermedad coronaria estable e inestable (90). Sólo un estudio previo (160) se ha realizado en pacientes con SCA, siendo ésta una población especial con particularidades clínicas e inflamatorias (162), y aunque no encontró un impacto de CYP3A4 sobre la reactividad plaquetar, su ajuste estadístico por variables clínicas fue relativamente incompleto.

1.10.1.4. CYP1A2

El gen CYP1A2 no presenta polimorfismos de importancia clínica. Sin embargo, la enzima codificada por este gen influye en el metabolismo de clopidogrel por el efecto inductor del tabaco. Los pacientes fumadores presentan mayor actividad CYP1A2 que los no fumadores (115), con el consiguiente aumento de la exposición al metabolito activo y de los efectos farmacodinámicos del clopidogrel en los fumadores.

1.10.1.5. CYP2D6

La enzima CYP2D6 es responsable del metabolismo del 25% de los fármacos de la práctica clínica. El gen CYP2D6 reside en el cromosoma 22 y se han descrito más de 40 variantes alélicas que se correlacionan con cuatro fenotipos (ultrarrápido, extensivo, intermedio y pobre). Las variantes alélicas más frecuentes en la población caucásica para el fenotipo pobre metabolizador son CYP2D6*4 y CYP2D6*3 mientras que las variantes CYP2D6*10 y CYP2D6*17 son más frecuentes en asiáticos y africanos, respectivamente. Por su parte, las mutaciones responsables del fenotipo ultrarrápido presentan una frecuencia muy baja en caucásicos (123).

En el estudio de Mega et al. (62) se observó que los portadores de los alelos de pérdida de función de CYP2D6 tenían una tendencia hacia una menor concentración de metabolito activo de clopidogrel y una menor reducción de la agregación plaquetaria que los no portadores.

1.10.2. Paraoxonasa 1 (PON1)

Otra enzima que participa en la activación del clopidogrel, concretamente en la conversión de 2-oxo-clopidogrel en su metabolito activo, es la PON1 que es una esterasa que cataliza una reacción de escisión hidrolítica del anillo γ -tiobutirolactona del 2-oxo-clopidogrel al tiol farmacológicamente activo (163).

El polimorfismo más estudiado para el gen que codifica esta enzima es Q192R, que consiste en una sustitución de glutamina (Q) por arginina (R) en la posición 192. La prevalencia de este polimorfismo varía entre grupos étnicos siendo los genotipos QQ y QR más frecuentes en caucásicos y los genotipos QR y RR en afroamericanos (148). Los resultados de la influencia de este polimorfismo en el metabolismo del clopidogrel son contradictorios. El estudio de Bouman et al. (163) subraya que la mutación Q192R resulta en una bioactivación de clopidogrel más efectiva y que el genotipo salvaje QQ se asocia con una menor exposición al metabolito activo y una menor inhibición plaquetaria de clopidogrel, por lo que los individuos portadores del genotipo silvestre tienen más riesgo de sufrir trombosis del stent que los individuos con el genotipo RR. Sin embargo, otros autores han observado que la reactividad plaquetaria es menor en los pacientes homocigotos RR (164) y que los pacientes con el alelo silvestre (QQ y QR) tienen mayor riesgo de complicaciones trombóticas (infarto de miocardio o trombosis del stent) que aquellos con el genotipo RR (165). Finalmente, en otros estudios no se ha encontrado

relación entre este polimorfismo y la eficacia y la seguridad de clopidogrel en pacientes con SCA (61,148,166–168).

1.10.3. Otros

Además de los polimorfismos relacionados con el metabolismo del clopidogrel, se han estudiado otras variaciones como las relacionadas con las diferencias en la absorción intestinal, en la inactivación o en la unión a la diana del fármaco (figura 11).

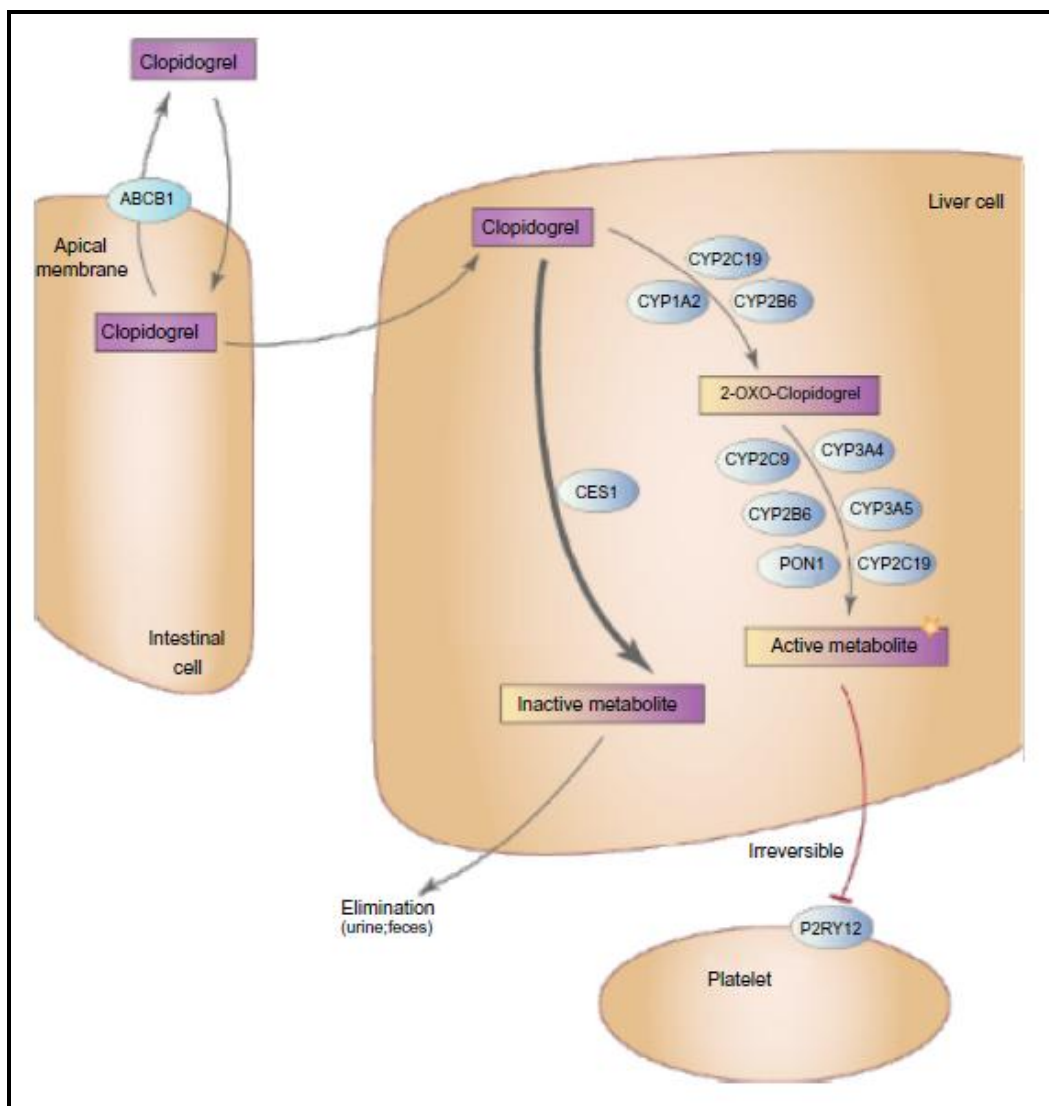


Figura 11. Principales proteínas implicadas en el transporte y el metabolismo de clopidogrel (169). ABCB1: gen de la proteína transportadora de ATB subfamilia B miembro 1; CES1: carboxilesterasa 1; CYP: citocromo P450; PON1: paraoxonasa 1; P2RY12: receptor P2Y₁₂.

El gen ABCB1 (“*ATP Binding Cassette subfamily B member 1*”) también conocido como MDR1 codifica la glicoproteína P que es responsable de la absorción intestinal de clopidogrel. Se ha investigado el papel del polimorfismo C3435T (rs1045642) sobre los niveles de metabolito activo, la reactividad plaquetar y los eventos cardiovasculares. En un estudio realizado en 2208 pacientes con IAM se observó que los pacientes homocigotos para el alelo T presentaban una tasa superior de eventos adversos cardiovasculares que los pacientes portadores de al menos un alelo C tras un año de seguimiento (170).

La carboxilesterasa 1 (CES1) es la primera enzima responsable de convertir clopidogrel, 2-oxo-clopidogrel y el metabolito activo en derivados carboxílicos inactivos. El 85% del clopidogrel administrado se degrada por esta enzima en el hígado. Hasta la fecha, se han llevado a cabo pocos estudios que evalúen el efecto de las variantes genéticas de CES1. Entre ellas se ha estudiado el polimorfismo G143E (rs71647871), que es una sustitución de una glicina por un ácido glutámico en la posición 143. Los pacientes portadores de la variante genética presentan niveles circulantes más elevados del metabolito activo de clopidogrel que los pacientes con el genotipo salvaje (171).

Por otra parte, ciertas variaciones genéticas en los genes responsables de la farmacodinamia de clopidogrel se han relacionado con alteraciones en la respuesta a clopidogrel. Se ha sugerido que dos polimorfismos, G52T (rs2046934) y T744C (rs2046934), se asocian con una mayor expresión del receptor de P2Y₁₂ y, por tanto, con una mayor reactividad plaquetaria en pacientes tratados con clopidogrel (172). Sin embargo, en estudios posteriores no se ha podido confirmar esta relación (173).

De manera similar, los polimorfismos en el gen ITGB3, que codifica la subunidad beta del receptor GPIIb/IIIa podrían relacionarse con la respuesta a clopidogrel y los eventos cardiovasculares (174).

1.11. Agregometría. Pruebas de función plaquetaria

Las pruebas de función plaquetaria se utilizan para monitorizar el resultado de la terapia antiagregante, simulando el proceso fisiológico de adhesión y de agregación de forma que permiten cuantificar la respuesta plaquetaria e identificar una función anormal.

Tradicionalmente, la agregometría de transmisión óptica ha sido el método más utilizado para evaluar la respuesta plaquetaria al tratamiento con clopidogrel y se considera el “gold estándar”. Sin embargo, su aplicación clínica presenta una serie de problemas, como la necesidad de personal altamente cualificado, el volumen de sangre necesario, las centrifugaciones repetidas y la duración de la técnica. Además, se trata de una prueba inespecífica ya que también mide la agregación provocada por la unión del ADP a su receptor P2Y₁, el cual no es inhibido por el clopidogrel. Todo esto hace que su utilización de forma rutinaria esté limitada.

El análisis VerifyNow P2Y₁₂[®] (Accumetrics, San Diego, California) es un método estandarizado de diagnóstico a la cabecera del paciente, rápido y fácil de utilizar, que mide la velocidad y extensión agregación plaquetaria inducida por ADP (figura 12).

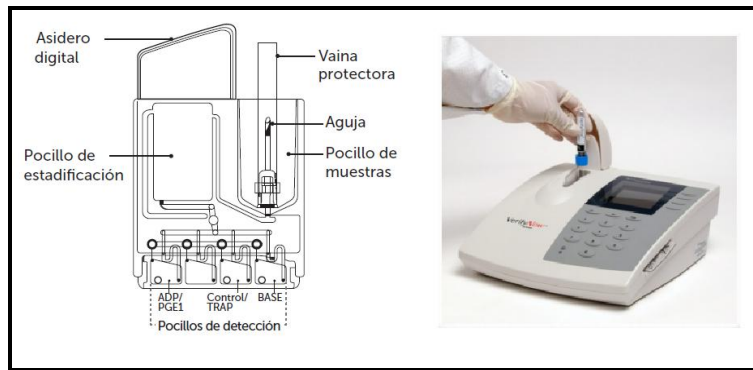


Figura 12. Sistema VerifyNow P2Y₁₂.

El dispositivo de ensayo contiene una preparación liofilizada de perlas revestidas de fibrinógeno humano, activadores de plaquetas y una mezcla tampón. Este sistema de detección óptica realiza una medición turbidimétrica de la aglutinación de las plaquetas a las microesferas revestidas de fibrinógeno, basándose en la capacidad de las plaquetas activadas para unirse al fibrinógeno. Las micropartículas recubiertas de fibrinógeno se agregan en la sangre completa de forma proporcional al número de receptores plaquetarios de la GP IIb/IIIa expresados (figura 13).

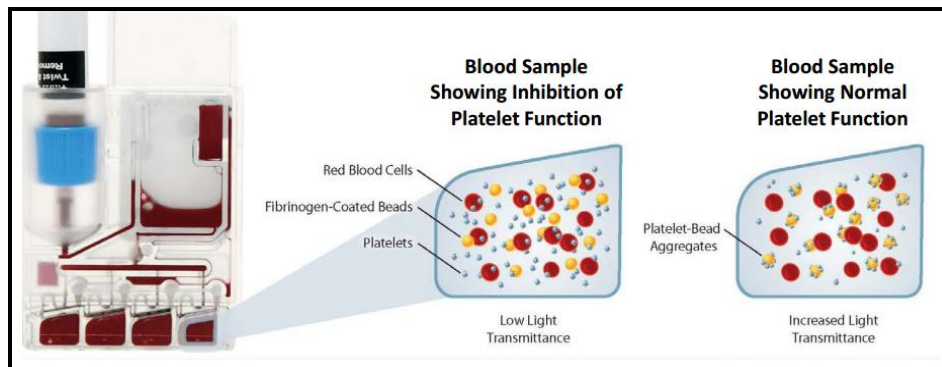


Figura 13. Aglutinación de las plaquetas a las microesferas de fibrinógeno.

El instrumento VerifyNow P2Y₁₂ mide la agregación de las plaquetas como un aumento de transmisión de la luz y utiliza un algoritmo para comunicar el cambio de la señal óptica en unidades de reacción de P2Y₁₂ (PRU). Cuanto menor es el valor de PRU, es decir, cuanto

menor es la reactividad plaquetaria, mayor es la inhibición de la agregación plaquetaria producida por el clopidogrel (figura 14).

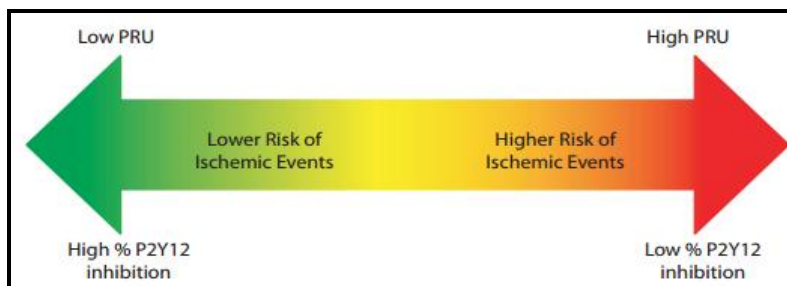


Figura 14. Relación entre la reactividad plaquetaria y el riesgo de eventos isquémicos.

La tasa de agregación de las microsferas es más rápida y reproducible si las plaquetas están activadas; por tanto, se incorpora como agonista el reactivo ADP al canal de prueba para inducir la activación plaquetaria. Se incluye en la mezcla reactiva prostaglandina E1 (PGE₁) para reducir la unión de ADP a los receptores P2Y₁ y aumentar la especificidad del resultado de PRU para reflejar la agregación plaquetaria mediada por P2Y₁₂ (175). Los reactivos están formulados para que alcancen concentraciones de reacción de ADP 20 μM y PGE1 22 nM. De modo similar, se incorporan a un segundo canal del dispositivo de prueba otros dos activadores: iso-TRAP (péptido activador del receptor de la trombina) con PAR4-AP (péptido activador del PAR4) y micropartículas recubiertas de fibrinógeno. Iso-TRAP induce la agregación plaquetaria independientemente del receptor P2Y₁₂. El sistema mide el cambio en la transmisión de este canal como un aumento de luz, calcula la función plaquetaria basal de la muestra y comunica el resultado de porcentaje de inhibición para la muestra (176,177).

El análisis VerifyNow P2Y₁₂ se ha diseñado para facilitar el control de pacientes que han sido tratados con inhibidores del receptor P2Y₁₂ al identificar a los pacientes que corren mayor riesgo de futuros episodios trombóticos o hemorrágicos (68,69,178). Se trata de un

método que aporta los resultados de la respuesta al clopidogrel en menos de 5 minutos, sin necesidad de preparar la muestra y con bajos volúmenes de la misma.

Finalmente, los resultados del sistema VerifyNow P2Y₁₂ muestran una buena correlación con los métodos ópticos de agregometría convencionales (68,179,180) así como la capacidad de identificar a los pacientes con mayor riesgo de eventos adversos cardiovasculares (63).

**Justificación,
hipótesis y
objetivos**

2. Justificación

Los beneficios de la doble antiagregación con aspirina y clopidogrel en pacientes con SCA sometidos a ICP están ampliamente confirmados. Sin embargo, a pesar de una adecuada adherencia al tratamiento, una proporción sustancial de pacientes presenta una respuesta disminuida al clopidogrel, lo que se asocia con un mayor riesgo de complicaciones isquémicas.

Entre los distintos factores que pueden explicar la respuesta farmacológica a clopidogrel se encuentran los factores genéticos, entre otros los relacionados con su metabolismo.

En los últimos 15 años se han desarrollado dispositivos a la cabecera del paciente, como el VerifyNow[®], que identifican a los pacientes pobre respondedores en pocos minutos y sin necesidad de procesar la muestra.

Por este motivo nos planteamos analizar la importancia de un grupo de 6 polimorfismos relacionados potencialmente con una pobre respuesta a clopidogrel.

3. Hipótesis

La hipótesis del presente trabajo es que los polimorfismos relacionados con el metabolismo de clopidogrel, más allá de variables clínicas, pueden justificar una fracción significativa de la variabilidad interindividual en la respuesta a clopidogrel, y por tanto, representar potenciales marcadores farmacogenéticos que podrían emplearse como herramientas para predecir la respuesta a este fármaco, facilitando con ello el tratamiento individualizado para cada paciente.

4. Objetivos

4.1. Objetivo principal

Examinar el impacto de un conjunto de seis polimorfismos implicados en el metabolismo de clopidogrel, ajustado por un panel extenso de variables clínicas, sobre la reactividad plaquetar en pacientes con SCA tratados con clopidogrel.

4.2. Objetivos secundarios

1. Cuantificar la prevalencia de la elevada reactividad plaquetar a pesar de tratamiento con clopidogrel.
2. Definir el perfil del paciente con elevada reactividad plaquetar a pesar del tratamiento con clopidogrel.
3. Comparar el valor del genotipado frente a las variables clínicas en la predicción de la elevada reactividad plaquetar a pesar de tratamiento con clopidogrel.
4. Evaluar el impacto pronóstico a 1 año del genotipado de seis polimorfismos relacionados con el metabolismo de clopidogrel.
5. Evaluar el impacto pronóstico a 1 año de la elevada reactividad plaquetar a pesar de tratamiento con clopidogrel.

Métodos

5. Métodos.

5.1. Población

Realizamos un estudio observacional y prospectivo, desde junio de 2011 a enero de 2012, de pacientes reclutados de forma prospectiva y consecutiva con diagnóstico de SCA, remitidos para cateterismo cardíaco que estaban recibiendo tratamiento con clopidogrel \geq 12 horas desde la dosis de carga de 300 ó 600 mg (a elección del médico responsable). En los pacientes en los que no se constató que hubieran recibido dosis de carga de clopidogrel, se exigió al menos 24 horas desde la primera dosis.

Se obtuvieron de forma detallada las características clínicas y demográficas de cada paciente incluidos los antecedentes y comorbilidades, así como el tratamiento concomitante y la información detallada de la ICP. Las variables recogidas fueron edad, sexo, peso, talla, factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo, diabetes), antecedentes de cardiopatía isquémica personales o familiares, antecedentes de revascularización coronaria, diagnóstico al ingreso, elevación de marcadores miocárdicos de necrosis (troponina cardíaca o creatinquinasa isoforma MB), cambios electrocardiográficos al ingreso (anormalidades de la onda T y/o descenso/ascenso del segmento ST), datos analíticos al ingreso (hemoglobina, hematocrito, leucocitos, recuento plaquetar, colesterol total, colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) y LDL (lipoproteínas de baja densidad), triglicéridos, creatinina sérica y filtrado glomerular estimado), fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), reactividad plaquetar y porcentaje de inhibición plaquetar, medicación concomitante, número de vasos coronarios afectados, número y tipo de stents y longitud total, eventos intrahospitalarios y durante el seguimiento (angina inestable, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, trombosis del stent y muerte por cualquier causa).

Se implantaron stents metálicos convencionales o liberadores de fármacos, siguiendo las recomendaciones actuales, según el criterio del cardiólogo intervencionista. Tras la ICP, todos los pacientes recibieron aspirina y clopidogrel.

Se consideraron como criterios de exclusión la presencia de valvulopatías o miocardiopatías significativas, las enfermedades concomitantes con una esperanza de vida inferior a un año, los pacientes que no firmaron el consentimiento informado y aquellos pacientes que fueron tratados con inhibidores endovenosos del receptor GP IIb-IIIa de la plaqueta.

Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de nuestro centro y cumple con la Declaración de Helsinki de 1975 y sus actualizaciones posteriores.

5.2. Función plaquetaria

Se extrajeron 15 cc de sangre periférica del introductor arterial antes del uso de anticoagulantes en la sala de hemodinámica. Se llenaron dos tubos de citrato sódico 3,2% (Vacuette[®], Greiner Bio-One, Monroe, North California) y se esperó un tiempo entre 15 y 30 minutos antes de la determinación, según las instrucciones del fabricante, para alcanzar la temperatura ambiente.

El efecto inhibitorio del clopidogrel en la reactividad plaquetar fue medido con el analizador VerifyNow[®] (Accumetrics Inc. San Diego, CA, EEUU). Los resultados del test se expresan como:

- “Unidades de reacción de P2Y₁₂ (PRU)”: reactividad plaquetar por agonistas del ADP, indican la cantidad de agregación mediada por el receptor P2Y₁₂ específica de la plaqueta y se calculan en función de la tasa y el grado de agregación plaquetaria en el canal de ADP.
- “PRU base”: estimación de la reactividad plaquetar (basal) por agonistas del receptor la trombina, es una medición independiente basada en la tasa y el grado de agregación plaquetaria en el canal basal. Este resultado sirve como estimulación de la función plaquetaria basal del paciente independiente de la inhibición del receptor P2Y₁₂.
- “Porcentaje de inhibición”: es el cambio porcentual respecto a la agregación basal y se calcula a partir del resultado de PRU y de PRU base.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{BASE} - \text{PRU}}{\text{BASE}} \times 100$$

Se empleó el punto de corte PRU \geq 208 especificado por el fabricante para la definición del paciente pobre respondedor (176) y utilizado en estudios previos en pacientes que se han sometido a intervención coronaria percutánea (181). Se ha observado que un valor inferior a 208 PRU se asocia con menor riesgo de muerte cardiovascular, infarto de miocardio y trombosis del stent (75).

5.3. Extracción del ADN

Se obtuvieron muestras de sangre periférica del introductor arterial en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de los que se extrajo la capa leucoplaquetar por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos.

La extracción del ADN se realizó de la capa leucoplaquetar utilizando el QIAamp[®] DNA minikit y el extractor automático de ácidos nucleicos QiaCube[®] (Qiagen, Hilden, Alemania). El sistema QIAamp[®] permite el aislamiento y purificación del ADN en cuatro etapas (lisis, unión, lavado y elución) que se integran sin interrupciones con el sistema automatizado QIAcube[®] (figura 13). El procedimiento de purificación es el siguiente (182):

- Lisis de las células presentes en la muestra de sangre en condiciones de desnaturalización a altas temperaturas.
- Unión del ADN del lisado celular a la membrana de la columna de centrifugación. Se añade etanol a los lisados y se dispensan en una columna de centrifugación, a medida que el lisado la atraviesa, el ADN se adsorbe sobre la membrana de gel de sílice mientras que los contaminantes pasan a través de la misma.
- Lavado de la membrana, mientras que el ADN se mantiene unido a la membrana de la columna de centrifugación, los contaminantes se eliminan de manera eficaz con dos soluciones tampón de lavado.
- Elución del ADN de la membrana con la solución tampón de elución.

La cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante metodología de absorbancia UV utilizando el espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer[®] (Hamburgo, Alemania).

5.4. Genotipado

Se estudiaron 6 tagged-SNPs que permiten identificar los siguientes alelos en genes involucrados en el metabolismo del clopidogrel (tabla 1): CYP2C9*2 (rs1799853), CYP2C9*3 (rs1057910), CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*17 (rs12248560), CYP3A4*1B (rs27405749) y PON1-Q192R (rs662) (169).

Tabla 1. Características de los polimorfismos estudiados.

Alelo	Cambio de nucleótido	Denominación	Efecto del alelo mutado	Actividad enzimática
CYP2C9*2	430C>T	rs1799853	Cambio de aminoácido	Disminuida
CYP2C9*3	1075A>C	rs1057910	Cambio de aminoácido	Disminuida
CYP2C19*2	681G>A	rs4244285	Defecto de empalme	Ninguna/Disminuida
CYP2C19*17	-806C>T	rs12248560	Aumento de la transcripción	Aumentada
CYP3A4*1B	-392A>G	rs27405749	Variación en el promotor	Disminuida
PON1-Q192R	575A>G	rs662	Cambio de aminoácido	Disminuida

Se analizaron los genotipos sin conocer los valores de agregación plaquetaria ni la evolución clínica de los pacientes.

El genotipado se realizó mediante discriminación alélica (CYP2C19*2, CYP2C19*17 y PON1-Q192R) por medio de sondas TaqMan[®] proporcionadas por Applied Biosystems (Foster City, CA, EEUU) o mediante sondas KASPar[®] (CYP2C9*2, CYP2C9*3 y CYP3A4*1B) (KBiosciences, Hertfordshire, Reino Unido).

Las sondas TaqMan[®] y las sondas KASPar[®] se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuyo objetivo es copiar millones de veces una secuencia específica de

ADN mediante una reacción llevada a cabo por la enzima ADN polimerasa. La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que se realiza en termocicladores y participan los siguientes elementos: el molde (ADN), la enzima ADN polimerasa, los cebadores o “*primers*” que son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia que se desea amplificar y son complementarios a ésta, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs): adenina, timina, citosina y guanina, que son las bases nitrogenadas con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN, el ion magnesio que es el cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, una solución amortiguadora o *buffer* y agua como disolvente de la reacción.

5.4.1. Genotipado mediante sondas TaqMan®

El genotipado de los polimorfismos CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*17 (rs12248560) y PON1-Q192R (rs662) se realizó mediante sondas TaqMan® en el Termociclador a tiempo real 7500 Fast® de Applied Biosystems (Foster City, CA, EEUU). Estas sondas están validadas y separan las muestras en tres grupos: homocigotos para un alelo, homocigotos para el otro alelo y heterocigotos.

El análisis de fluorescencia mediante sondas TaqMan® se basa en *primers* específicos de alelo que contienen dos tipos de moléculas fluorescentes (fluorocromos) según el alelo y un apantallador o *quencher* de esta fluorescencia. La sonda TaqMan® es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de cada alelo. Esta sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' o *reporter* (FAM o VIC) y otro unido en el extremo 3' o *quencher* (NFQ). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* mediante un proceso conocido como transferencia de energía de resonancia de

Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. Si la secuencia de ADN complementaria a los cebadores y a la sonda está presente, se produce la unión de estos oligonucleótidos con el ADN molde. Cuando la ADN polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador degrada las sondas gracias a su actividad 5' exonucleasa. Esta degradación hace que el *reporter* y el *quencher* se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es registrado por los detectores del termociclador.

La separación de la sonda del ADN posibilita que el proceso de extensión del *primer* continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto generado. Así, se diseña una sonda TaqMan[®] con la secuencia que correspondería al alelo 1 unido a un fluorocromo (VIC) y otra sonda con la secuencia que correspondería al alelo 2 (FAM). Cada sonda se unirá de manera específica a su secuencia complementaria, y al unirse será cuando la ADN polimerasa separe el *reporter* del *quencher* y la fluorescencia emitida será específica de la secuencia a la que era complementaria (figura 15).

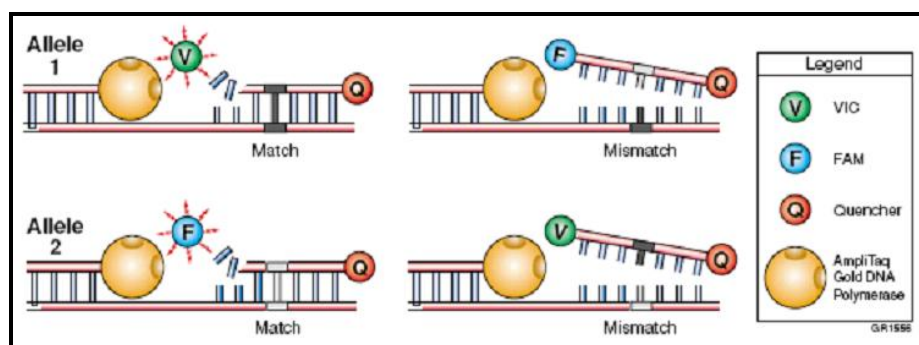


Figura 15. Funcionamiento de una sonda TaqMan[®]. Cada sonda, unida a un fluorocromo diferente, se une de manera específica a una secuencia concreta, y la ADN polimerasa al ejercer su actividad 5' exonucleasa permite la liberación del fluorocromo y la consecuente emisión de fluorescencia.

Para realizar la amplificación del fragmento de ADN de interés para cada polimorfismo mediante la PCR, se prepara una mezcla con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contiene AmpliTaq Gold ADN polimerasa, dNTPs con dUTP, más las sondas específicas del gen, agua destilada y ADN. Las concentraciones y volúmenes específicos de cada reactivo se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de la mezcla de la reacción para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa.

Reactivo	Concentración	Volumen/muestra
2X TaqMan PCR Master Mix	1X	12.5
20X SNP Genotyping Assay	1X	1.25
ADN	10ng/ul	11.25

Las reacciones se llevan a cabo en la placa de 96 pocillos MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate[®] (Applied Biosystems). Se carga toda la placa, se cubre con un adhesivo de calidad óptica y se coloca en el bloque térmico del sistema de detección 7900HT Fast Real-Time PCR[®] (Applied Biosystems). Las condiciones para la amplificación mediante la PCR son:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos
- Paso de alineamiento 40 ciclos:
 - Desnaturalización a 95°C durante 15 segundos
 - Anillado y extensión a 60°C durante 1 minuto

Tras la amplificación se procede a la discriminación alélica, empleándose el software de detección 7500HT Fast Real-Time PCR que clasifica las muestras según la fluorescencia (figura 16).

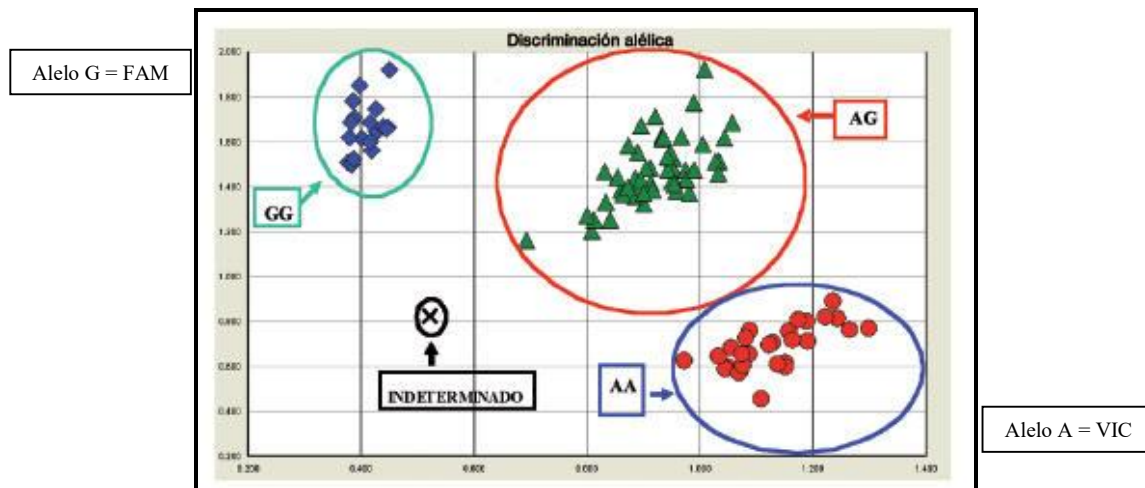


Figura 16. Representación de la intensidad de señal emitida por cada fluorocromo asociado a un alelo diferente. El eje X corresponde a la intensidad de señal del fluorocromo VIC asociado al alelo A, y el eje Y a la señal del fluorocromo FAM asociado al alelo G. Dependiendo de la intensidad de cada uno de ellos se clasificarán como: homocigoto alelo A (si sólo existe fluorescencia VIC), homocigoto alelo G (si sólo existe fluorescencia FAM) y heterocigoto (si existen ambas fluorescencias).

El incremento del ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

5.4.2. Genotipado mediante sondas KASPar[®]

La detección de los polimorfismos CYP2C9*2 (rs1799853), CYP2C9*3 (rs1057910 y CYP3A4*1B (rs27405749) se realizó mediante sondas KASPar[®] (KBiosciences, Hertfordshire, Reino Unido) empleando tecnología FRET. El ensayo KASPar[®] es capaz de discriminar mediante una PCR alelo específica competitiva, los alelos de un SNP en un locus específico a partir de ADN genómico, utilizando el equipo de PCR-RT 7500F[®] de Applied Biosystems (Foster City, CA, EEUU) en placa de 96 pocillos.

Este sistema utiliza una Taq polimerasa modificada sin actividad 3'-5' exonucleasa y cebadores que generan productos de PCR fluorescentes que permiten genotipar el SNP en un único paso. Este sistema está diseñado como un ensayo multiplex que detecta ambos alelos en un único tubo de reacción con tres *primers* específicos para el SNP sin marcar y dos *primers* universales marcados con fluorescencia. Estos últimos *primers* si no se unen al ADN molde adoptan una estructura de horquilla en donde la molécula de fluorocromo se encuentra muy próxima a un *quencher* que le impide la emisión de fluorescencia. En cambio, cuando son complementarios al ADN molde, la estructura de horquilla se rompe y el fluorocromo es capaz de emitir fluorescencia que es medida por el detector.

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones (figura 17):

- 94°C durante 15 minutos
- 35 ciclos de 57°C durante 25 segundos
- 72°C durante 40 segundos.

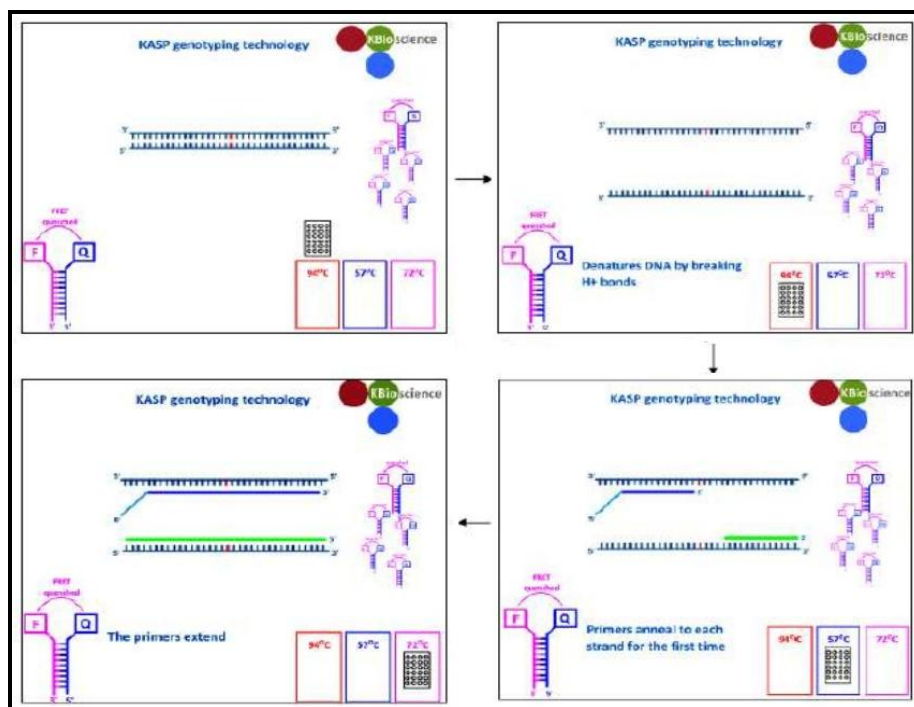


Figura 17. Etapas del genotipado con sondas KASPar®. Los detalles del método utilizado se pueden encontrar en <http://www.kbioscience.co.uk>

5.5. Definiciones.

- Diabetes mellitus: glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dL, glucemia ocasional ≥ 200 mg/dL y síntomas de diabetes mellitus (poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso), glucemia plasmática ≥ 200 mg/dL a las 2 horas de una prueba de tolerancia oral de glucosa (75 g de glucosa), hemoglobina glicosilada $\geq 6,5\%$ o precisar tratamiento hipoglucemiante.
- Dislipemia: cifras de colesterol total ≥ 220 mg/dL y/o colesterol LDL ≥ 130 mg/dL o precisar tratamiento hipolipemiante.
- Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) deprimida: volumen de eyección dividido por el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo inferior al 50%, evaluada mediante ecocardiograma o ventriculografía.
- Hipertensión arterial (HTA): tensión sistólica ≥ 140 mm Hg y/o tensión diastólica ≥ 90 mm Hg o precisar tratamiento hipertensivo.
- Infarto peri-angioplastia: elevación de troponina I y/o creatinquinasa isoforma MB ≥ 3 veces respecto del nivel de referencia en nuestro medio si los niveles eran normales previamente o cualquier re-elevación (si ya eran elevados) sobre los niveles previos tras el procedimiento intervencionista. Con esta finalidad y como es práctica en nuestro centro, se determinaron la troponina I y creatinquinasa isoforma MB en tres ocasiones dentro de las primeras 24 horas tras el procedimiento.
- Pobre respuesta a clopidogrel (PRC): como se ha indicado anteriormente, definimos PRC como una elevada reactividad plaquetar definida como un valor de PRU igual o superior a 208 unidades mediante el sistema VerifyNow P2Y₁₂.

- Síndrome Coronario Agudo (SCA): evento cardíaco agudo producido por una obstrucción parcial o completa de una arteria coronaria. Abarca el SCA con elevación del segmento ST (SCACEST), el SCA sin elevación del segmento ST (SCASEST) y la angina inestable. Su diagnóstico se realiza en base a los hallazgos clínicos que incluyen el dolor torácico típico, los cambios en el electrocardiograma (alteraciones de la onda T/segmento ST sugestivas de isquemia) y la elevación de marcadores de necrosis miocárdica (183).
- Tabaquismo activo: pacientes fumadores activos.
- Trombosis del stent: se puede diferenciar entre probable y definitivo. Se define trombosis del stent definitivo como el síndrome coronario agudo y, o bien la confirmación angiográfica de trombosis o la confirmación patológica de trombosis, mientras que se considera como trombosis del stent probable como la muerte inexplicable o infarto de miocardio en el territorio de un stent sin confirmación angiográfica (46).

5.6. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media [\pm desviación estándar (DE)] para variables continuas con distribución normal o como mediana [rango intercuartílico (RI)] para las no normales. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de los datos. Las variables categóricas se muestran como frecuencia (porcentaje). Realizamos una valoración transversal para explorar las variables asociadas a una PRC mediante análisis univariado (test de ji-cuadrado o el test de Fischer para las variables categóricas y el test t de Student para las variables continuas).

La confirmación de que los genotipos cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó utilizando la prueba de ji-cuadrado de Pearson utilizando la calculadora de la Universidad de Tufts, EEUU.

Se realizaron modelos de regresión logística binaria siendo la variable dependiente PRC ($PRU \geq 208$). Fueron covariables aquellas que demostraron asociación en el análisis univariado ($p < 0,05$) o en estudios previos, bajo una perspectiva explicativa. Estas variables fueron introducidas en un bloque mediante método por pasos hacia atrás y estadístico de razón de verosimilitud. Los polimorfismos de interés fueron introducidos en un segundo bloque mediante método introducir. Se presenta la odds ratio (OR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%). La calibración del modelo se calculó con el test de Hosmer-Lemeshow y la discriminación mediante el estadístico C. Estimamos el score ji-cuadrado de cada covariable del modelo como método para evaluar la importancia relativa de cada una dentro del mismo. Adicionalmente, calculamos el estadístico C (con su correspondiente intervalo de confianza al 95%) para el modelo que solo incluía variables clínicas, y lo comparamos con aquel que añadía los polimorfismos genéticos, y se compararon mediante un test de contraste de hipótesis.

En la evaluación longitudinal, realizamos estadística univariante para analizar las variables asociadas con eventos adversos durante el seguimiento y análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier y test de rangos logarítmicos. El presente estudio fue concebido como exploratorio (piloto) y por ello no se realizó un cálculo del tamaño muestral a priori.

El valor $p < 0,05$ fue elegido como punto de corte para la significación estadística en todos los análisis. Se emplearon STATA 11 (StataCorp. 2009, TX, USA) y SPSS v20.0 (IBM, USA) para realizar los análisis estadísticos.

5.7. Seguimiento.

El seguimiento de los pacientes a 1 año se realizó telefónicamente y a través de las visitas rutinarias en consultas externas. Se obtuvieron datos de seguimiento en el 100% de los pacientes.

Se registró adicionalmente la incidencia de IAM peri-angioplastia intrahospitalaria basándose en su asociación con la elevada reactividad plaquetar observada en estudios previos (63,71,78).

Durante el seguimiento extrahospitalario la variable principal fue el combinado de angina inestable (que requiriera ingreso), IM no fatal, muerte por cualquier causa, accidente cerebrovascular (ACV) y trombosis de stent (confirmada angiográficamente).

Resultados

6. Resultados

6.1. Características basales

Durante el periodo de estudio se incluyeron 278 pacientes, el 30,6% eran mujeres y la edad media fue 66 (± 11) años. La distribución porcentual por grupos de edad se muestra en la figura 18. El índice de masa corporal (IMC) medio fue 30,0 ($\pm 15,8$) kg/m². Más del 90% presentaba al menos uno de los factores de riesgo cardiovascular “clásicos”: hipertensión arterial (HTA), diabetes, dislipemia o tabaquismo. El 64,4% (n=179) presentaba HTA, el 58,3% (n=162) dislipemia, el 30,9% (n=86) eran fumadores activos y cabe destacar la elevada proporción de pacientes con diabetes mellitus (n=108, 38,8%) en la cohorte (figura 19).

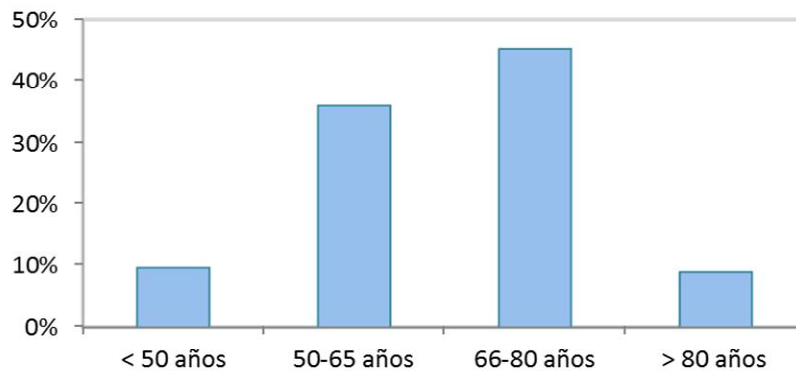


Figura 18. Edad por grupos.

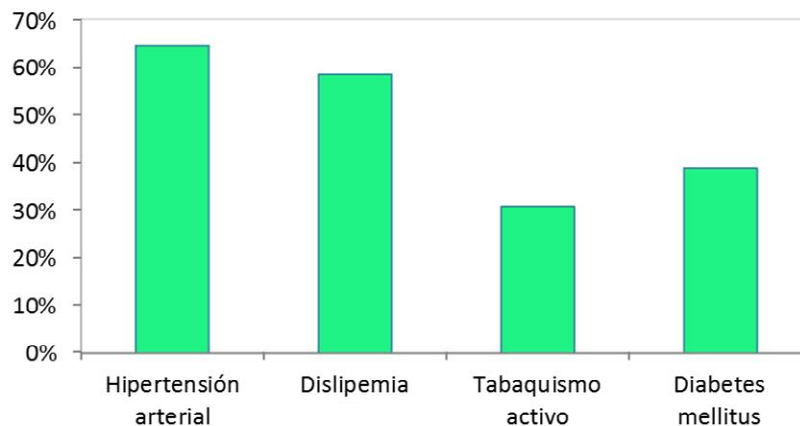


Figura 19. Factores de riesgo cardiovascular.

El resto de características y comorbilidades de los pacientes del estudio se muestran detalladamente en la tabla 3.

Tabla 3. Comorbilidades.

	Cohorte total (n=278)
Cardiopatía isquémica previa, n (%)	121 (43,5)
AF cardiopatía isquémica, n (%)	23 (8,3)
Angioplastia coronaria percutánea previa, n (%)	84 (30,2)
Bypass aorto-coronario, n (%)	12 (4,3)
Ictus, n (%)	10 (3,6)
Arteriopatía periférica, n (%)	11 (4,0)
EPOC, n (%)	18 (6,5)
IRC, n (%)	19 (6,8)

AF= Antecedentes familiares, EPOC= enfermedad pulmonar obstructiva crónica, IRC= Insuficiencia renal crónica.

En su gran mayoría se trató de pacientes con SCA sin elevación persistente del segmento ST (n=182, 65,5%), mientras que en 56 pacientes (20,1%) el diagnóstico fue SCA con elevación del segmento ST. La incidencia de insuficiencia cardíaca al ingreso (definida como un clase KILLIP > I), era del 9,7% (n=27). En un 63,7% de los casos (n=177) apreciamos elevación de troponina I por encima del valor de referencia de nuestro laboratorio (>0,045 ng/mL). La función sistólica del ventrículo izquierdo se encontraba deprimida en el 21,7% de los pacientes (n=55).

6.2. Valores de laboratorio

Los valores de laboratorio resultantes de la analítica realizada al ingreso se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Datos de laboratorio al ingreso.

	Cohorte total (n=278)
Hemoglobina, g/dL	13,8±1,9
Hematocrito, %	41,2±5,0
Plaquetas, x10e9/L	212,1±55,0
Leucocitos, x10e9/L	9,2± 8,4
Creatinina, mg/dL	1,0±0,5
MDRD, mL/min/1,73m ²	84,0±28,8
Colesterol total, mg/dL	176,0±48,5
Colesterol HDL, mg/dL	38,3±12,0
Colesterol LDL, mg/dL	107,3±39,2
Triglicéridos, mg/dL	150,5±84,2

HDL= lipoproteínas de alta densidad, LDL= lipoproteínas de baja densidad, MDRD= filtrado glomerular según la fórmula *Modification of Diet in Renal Disease* abreviada.

6.3. Tratamiento con clopidogrel

Un 57,2% de los pacientes del estudio (n=159) recibieron dosis de carga de clopidogrel, siendo la dosis de 300 mg la más frecuente (n=139, 91,4%). Entre los demás pacientes, la dosis más común era de 75 mg diarios (n=118, 99,2%). Un 83,1% de los pacientes (n=231) eran clopidogrel naïve a la entrada en el estudio (no recibían clopidogrel previamente al ingreso actual). La mediana de tiempo desde la primera dosis de clopidogrel hasta la determinación de la agregación plaquetar fue de 5 días (rango intercuartílico 2-10).

6.4. Tratamiento concomitante

La medicación concomitante a la toma de clopidogrel (tratamiento intrahospitalario) se muestra en la tabla 5. Destacamos que en un 37,9% de los casos, el paciente recibió un inhibidor de bomba de protones simultáneamente, siendo el pantoprazol el más frecuente (63,8%) y a la dosis de 40 mg cada 24h (63,6%). Un 83,7% recibieron estatinas, sobretudo

atorvastatina (91,3%) y a la dosis de 80 mg cada 24h (50,6%). Un 16,4% de los pacientes recibieron un antagonista de los canales de calcio siendo el amlodipino el más prescrito (71,1%) y a la dosis de 5 mg diarios (51,1%).

Tabla 5. Tratamiento concomitante intrahospitalario.

	Cohorte total (n=278)
Salicilatos, n (%)	278 (100)
IBP, n (%)	105 (37,9)
Anti H ₂ , n (%)	102 (36,8)
Estatinas, n (%)	231 (83,7)
IECA o ARAII, n (%)	206 (74,9)
Diuréticos del asa, n (%)	51 (18,5)
Alfa bloqueantes, n (%)	9 (3,3)
Beta bloqueantes, n (%)	210 (76,1)
Nitratos, n (%)	95 (34,5)
Antagonistas canales calcio, n (%)	45 (16,4)
Antagonista aldosterona, n (%)	14 (5,1)

AntiH₂= Antagonistas de los receptores H₂, ARAII= Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II, IBP= Inhibidores de la Bomba de Protones, IECA= Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina.

6.5. Angiografía

Respecto a las características angiográficas, el número medio de vasos con lesiones significativas fue 1,5 ($\pm 1,1$). El 45,0% de los pacientes presentaban enfermedad de un solo vaso, el 24,1% enfermedad de dos vasos y el 12,6% enfermedad de tres vasos. Se objetivó lesión en la arteria descendente anterior en el 55,4% (n=153), en la arteria coronaria derecha en el 49,6% (n=127), en la arteria circunfleja en el 38,4% (n=106) y en el tronco coronario izquierdo en el 5,8% (n=16). Un 2,5% de los pacientes presentaron enfermedad significativa de los injertos arteriales o venosos.

El número medio de lesiones coronarias tratadas fue 1,1 ($\pm 0,9$), con una media de 1,2 ($\pm 1,0$) stents implantados, siendo la longitud total media de 29 (± 28) mm. Se implantó al menos un stent en el 76,3% de los pacientes (n=212). Del total, el 70,6% fueron stents farmacoactivos. En la tabla 6 se muestra la información relativa al procedimiento intervencionista.

Tabla 6. Procedimiento intervencionista.

	Pacientes con stent (n=212)
Stent farmacoactivo, n (%)	149 (70,6)
BiolimusA9 “Biomatrix [®] -Nobori [®] ”, n (%)	50 (23,7)
Zotarolimus “Endeavor [®] ”, n (%)	54 (25,6)
Sirolimus “Cypher [®] /Cre8 [®] ”, n (%)	18 (8,5)
Tacrolimus “Optima [®] ”, n (%)	4 (1,9)
Everolimus “Xience [®] ”, n (%)	23 (10,9)
Balón Paclitaxel, n (%)	4 (1,9)
BMS, n (%)	44 (20,9)
Combinación*, n (%)	14 (6,6)

BMS=*Bare metal stent* (stent metálico)

* representa una combinación de balón y stent o stent metálico y farmacoactivo.

6.6. Medicación al alta

Tras el ingreso hospitalario, el 81,9% de los pacientes fueron dados de alta con clopidogrel, siendo la dosis de 75 mg diarios la más frecuente (81,7%). El resto del tratamiento se muestra en la tabla 7. Destacamos que en el 40,3% se prescribió un IBP siendo el pantoprazol el más frecuente (57,0%) seguido de omeprazol (28,0%), mientras que en el 19,4% se prescribió un antagonista de los receptores H₂, mayoritariamente ranitidina (97,9%).

Tabla 7. Tratamiento farmacológico al alta.

	Cohorte total (n=278)
Salicilatos, n (%)	250 (96,2)
Prasugrel, n (%)	11 (4,3)
Anti H ₂ , n (%)	48 (19,4)
IBP, n (%)	100 (40,3)
IECA y ARA II, n (%)	207 (81,8)
Diuréticos del asa, n (%)	48 (19,4)
Alfa bloqueantes, n (%)	8 (3,2)
Beta bloqueantes, n (%)	212 (83,8)
Nitratos, n (%)	41 (16,2)
Antagonistas canales calcio, n (%)	44 (17,4)
Estatinas, n (%)	231 (91,3)
Antagonista aldosterona, n (%)	11 (4,1)
Acenocumarol, n (%)	12 (4,7)

AntiH₂=antagonistas de los receptores H₂, ARAII=Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II, IBP=Inhibidores de la Bomba de Protones, IECA=Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina.

6.7. Polimorfismos.

La tabla 8 muestra la distribución de frecuencias de los genotipos CYP3A4*1B, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*17 y PON1-Q192R. De forma importante, los polimorfismos de este estudio estuvieron en su totalidad de acuerdo con la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg (p = 0,798, p = 0,566, p = 0,388, p = 0,925, p = 0,469 y p = 0,210, respectivamente).

Tabla 8. Distribución de frecuencias de los genotipos.

	Homocigotos salvajes	Heterocigotos	Homocigotos para la variante
CYP3A4 variante 1B, n (%)	252 (91,6)	23 (8,4)	0
CYP2C9 variante 2, n (%)	177 (66,3)	80 (30,0)	10 (3,7)
CYP2C9 variante 3, n (%)	232 (84,7)	41 (15,0)	1 (0,3)
CYP2C19 variante 2, n (%)	201 (72,6)	72 (26,0)	4 (1,4)
CYP2C19 variante 17, n (%)	172 (61,9)	93 (33,4)	13 (4,7)
PON1 Q192R, n (%)	121 (44,2)	115 (41,9)	38 (13,9)

CYP = citocromo P450, PON1 = paraoxonasa 1

Debido a la baja prevalencia de pacientes homocigotos para la variante, se muestran los pacientes heterocigotos y homocigotos en el mismo grupo (tabla 9). El polimorfismo más frecuente fue PON1-Q192R [≥ 1 alelo C (R) presente en el 55,8%], mientras que el más infrecuente fue CYP3A4 (≥ 1 alelo 1B presente en el 8,4%). El resto de polimorfismos presentaron frecuencias entre el 15,3 y el 38,1%.

Tabla 9. Prevalencia de los polimorfismos hepáticos relacionados con el metabolismo de clopidogrel.

	Cohorte total (n=278)
CYP3A4 ≥ 1 alelo 1B, n (%)	23 (8,4)
CYP2C9 ≥ 1 alelo *2, n (%)	90 (33,7)
CYP2C9 ≥ 1 alelo *3, n (%)	45 (15,3)
CYP2C19 ≥ 1 alelo *17, n (%)	106 (38,1)
CYP2C19 ≥ 1 alelo *2, n (%)	76 (27,4)
PON1-Q192R ≥ 1 alelo C (R), n (%)	153 (55,8)

CYP = citocromo P450, PON1 = paraoxonasa 1

6.8. Agregometría

En la cohorte total los valores medios de PRU fueron de $261,1 \pm 78,3$ U, de PRU base de $298,8 \pm 55,2$ U y de porcentaje de inhibición a P2Y12 de $15,8 \pm 17,7\%$. Identificamos como pobre respondedores (PRU > 208) a 206 (74,1%) pacientes.

La tabla 10 muestra los resultados de agregometría para los seis polimorfismos. Los pacientes portadores de ≥ 1 alelo *2 para CYP2C19 presentaron valores de PRU significativamente mayores respecto a los sujetos con genotipo original o “wild type” (wt) y el porcentaje de inhibición fue también significativamente menor. En el análisis univariante, los pacientes portadores de ≥ 1 alelo *1B del CYP3A4 presentaron valores de PRU numéricamente superiores y de porcentaje de inhibición inferiores. Idéntica observación se hizo cuando realizamos los análisis dicotomizando por PRU < 208 U.

Tabla 10. Resultados de la agregometría para los polimorfismos hepáticos relacionados con el metabolismo de clopidogrel y reactividad plaquetar.

CYP3A4	wt/wt (n=252; 91,6%)	wt/*1B (n=23; 8,4%)	*1B/*1B (n=0)	p valor
PRU base	300,0±54,5	284,6±64,8	-	0,307
PRU	261,4±78,9	267,0±67,8	-	0,755
PRU < 208, n (%)	66 (26,2%)	4 (17,4%)	-	0,354
Porcentaje inhibición	15,9±17,7	11,9±15,5	-	0,398
Tiempo*, mediana (RI), días	5,0 (8)	7,0 (18)	-	0,311
CYP2C9 variante 2	wt/wt (n=177; 66,3%)	wt/*2 (n=80; 30,0%)	*2/*2 (n=10; 3,7%)	p valor
PRU base	299,0±55,1	301,4±57,0	293,9±50,9	0,677
PRU	265,9±78,7	252,1±79,3	280,3±63,2	0,423
PRU < 208, n (%)	39 (22,0%)	28 (35,0%)	1 (10,0%)	0,045
Porcentaje inhibición	14,7±17,2	18,0±18,7	12,6±14,3	0,247
Tiempo*, mediana (RI), días	5,0 (9)	4,5 (8)	5,5 (4)	0,703
CYP2C9 variante 3	wt/wt (n=232; 84,7%)	wt/*3 (n=41; 15,0%)	*3/*3 (n=1; 0,3%)	p valor
PRU base	299,1±55,1	291,5±50,7	400,0	0,219
PRU	262,8±79,1	257,3±73,5	288,0	0,789
PRU < 208, n (%)	59 (25,4%)	11 (26,8%)	0	0,827
Porcentaje inhibición	15,6±17,8	14,4±16,1	28,0	0,613
Tiempo*, mediana (RI), días	5,0 (8)	5,0 (6)	12,0	0,513

CYP2C19 variante 2	wt/wt (n=201; 72,6%)	wt/*2 (n=72; 26,0%)	*2/*2 (n=4; 1,4%)	p valor
PRU base	298,9±54,2	299,0±59,6	326,5±5,3	0,391
PRU	251,9±76,1	285,3±81,3	298,8±33,4	0,020
PRU < 208, n (%)	50 (29,4%)	13 (18,1%)	0	0,084
Porcentaje inhibición	17,7±18,4	10,8±14,9	6,5±9,0	0,006
Tiempo*, mediana (RI), días	5,0 (9)	6,0 (7)	6,5 (6)	0,416
CYP2C19 variante 17	wt/wt (n=172; 61,9%)	wt/*17 (n=93; 33,4%)	*17/*17 (n=13; 4,7%)	p valor
PRU base	297,2±57,1	299,9±53,3	312,5±52,1	0,660
PRU	261,7±81,8	259,3±71,5	166,5±83,2	0,882
PRU < 208, n (%)	49 (28,5%)	22 (23,7%)	1 (7,7%)	0,213
Porcentaje inhibición	16,0±17,5	15,2±17,8	18,1±21,3	0,848
Tiempo*, mediana (RI), días	6,0 (8)	4,0 (8)	5,0 (9)	0,157
PON1 Q192R	TT (QQ) (n=121; 44,2%)	CT (QR) (n=115; 41,9%)	CC (RR) (n=38; 13,9%)	p valor
PRU base	298,0±55,8	299,8±56,0	300,3±51,9	0,961
PRU	263,1±75,4	254,3±79,5	275,6±84,1	0,482
PRU < 208, n (%)	30 (24,2%)	36 (31,3%)	6 (15,8%)	0,139
Porcentaje inhibición	15,2±17,3	17,2±18,5	14,1±17,1	0,479
Tiempo*, mediana (RI), días	4,0 (8)	5,0 (7)	7,0 (6)	0,217

CYP = citocromo P450, PON1 = paraoxonasa 1, wt = genotipo salvaje

* Tiempo entre la primera toma de clopidogrel y determinación de reactividad

6.9. Perfil del paciente con elevada reactividad plaquetar a pesar del tratamiento

Se presenta el perfil comparativo entre los pacientes normo y pobre-respondedores en la tabla 11. Los pobre-respondedores eran mayores y tenían menor prevalencia de tabaquismo activo.

Tabla 11. Características basales de la población.

	Pobre-respondedores (n=206, 74,1%)	Normo-respondedores (n=72, 25,9%)	p valor
Edad, años	67,3±11,0	61,9±11,0	<0,001
Sexo femenino	66 (32,0)	19 (26,4)	0,370
IMC, kg/m ²	30,6±18,2	28,2±4,2	0,265
FACTORES DE RIESGO			
HTA, n (%)	137 (66,5)	42 (58,3)	0,213
Dislipemia, n (%)	121 (58,7)	41 (56,9)	0,791
Diabetes mellitus, n (%)	83 (40,3)	25 (34,7)	0,404
Tabaquismo activo, n (%)	53 (25,7)	33 (45,8)	0,001
COMORBILIDADES			
Cardiopatía isquémica previa, n (%)	91 (44,2)	30 (41,7)	0,712
AF cardiopatía isquémica, n (%)	14 (6,8)	9 (12,5)	0,130
ACTP previa, n (%)	61 (29,6)	23 (31,9)	0,711
Bypass aorto-coronario, n (%)	9 (4,4)	3 (4,2)	1
Ictus, n (%)	8 (3,9)	2 (2,8)	1
Arteriopatía periférica, n (%)	7 (3,4)	4 (5,6)	0,483
EPOC, n (%)	16 (7,8)	2 (2,8)	0,172
IRC, n (%)	17 (8,3)	2 (2,8)	0,173

ACTP= Angioplastia coronaria transluminal percutánea, AF= Antecedentes familiares, EPOC= enfermedad pulmonar obstructiva crónica, HTA= hipertensión arterial, IMC= Índice de masa corporal, IRC= Insuficiencia renal crónica.

En cuanto a su situación clínica al ingreso, los pacientes pobre-respondedores presentaban mayor incidencia de insuficiencia cardíaca (clase KILLIP > I). Observamos una tendencia no significativa (p=0,07) hacia un mayor porcentaje de pacientes con disfunción sistólica del ventrículo izquierdo entre aquellos pobre-respondedores. Desde el punto de vista analítico, exhibieron valores de hematocrito, hemoglobina, colesterol total y filtrado glomerular estimado significativamente más bajos (tabla 12).

Tabla 12. Situación al ingreso.

	Pobre-respondedores (n=206, 74,1%)	Normo-respondedores (n=72, 25,9%)	p valor
KILLIP > I, n (%)	25 (12,1)	2 (2,8)	0,021
Cambios ECG*, n (%)	131 (63,6)	43 (59,7)	0,559
Elevación troponina I, n (%)	126 (61,2)	51 (70,8)	0,142
FEVI deprimida, n (%)	46 (24,3)	9 (13,8)	0,076
DATOS DE LABORATORIO			
Hemoglobina, g/dL	13,4±1,9	14,7±1,7	<0,001
Hematocrito, %	40,4±4,9	43,7±4,6	<0,001
Plaquetas, x10e9/L	214,9±56,0	204,1±51,7	0,153
Leucocitos, x10e9/L	9,6±9,5	8,2±2,9	0,228
Creatinina, mg/dL	1,0±0,5	0,9±0,3	0,092
MDRD, mL/min/1,73m ²	81,4±26,5	91,3±33,7	0,013
Colesterol total, mg/dL	172,1±47,0	186,2±51,1	0,045
Colesterol HDL, mg/dL	37,7±11,8	39,7±12,7	0,263
Colesterol LDL, mg/dL	105,6±39,2	111,8±39,1	0,294
Triglicéridos, mg/dL	142,6±70,9	171,4±110,0	0,055

ECG= electrocardiograma, FEVI= Función sistólica del ventrículo izquierdo, HDL= lipoproteínas de alta densidad, KILLIP= Presencia de insuficiencia cardiaca al ingreso según la clasificación Killip y Kimball, LDL= lipoproteínas de baja densidad, MDRD= filtrado glomerular según la fórmula Modification of Diet in Renal Disease abreviada.

*desviación de punto J \geq 1mm excepto en la serie precordial y/o presencia de onda T negativa simétrica \geq 3 mm excepto avR

Respecto al tratamiento con clopidogrel, no hubo diferencias entre pacientes pobre y normo-respondedores en el tiempo desde la primera dosis hasta la determinación de la agregación plaquetaria (8,75±16,28 días vs 9,14±8,90 días, p=0,846), en la administración de dosis de carga (116 pacientes (67,1%) vs 43 pacientes (70,5%), p=0,621) ni en el número de pacientes que habían recibido la dosis de carga de 300 mg de clopidogrel (100 pacientes (91,7%) vs 39 pacientes (90,7%), p=0,760).

En la tabla 13 se muestra la medicación concomitante a la toma de clopidogrel durante el ingreso hospitalario. No se encontraron diferencias significativas en dicha medicación durante el ingreso entre los pacientes con y sin PRC.

Tabla 13. Tratamiento intrahospitalario.

	Pobre-respondedores (n=206, 74,1%)	Normo-respondedores (n=72, 25,9%)	p valor
Salicilatos, n (%)	206 (100)	72 (100)	1
Anti H ₂ , n (%)	75 (36,6)	27 (37,5)	0,890
IBP, n (%)	80 (39,0)	25 (34,7)	0,517
IECA o ARAII, n (%)	149 (73,0)	57 (80,3)	0,225
Diuréticos del asa, n (%)	43 (21,1)	8 (11,1)	0,061
Alfa bloqueantes, n (%)	6 (2,9)	3 (4,2)	0,701
Beta bloqueantes, n (%)	153 (75,0)	57 (79,2)	0,476
Nitratos, n (%)	71 (35,0)	24 (33,3)	0,801
Antagonistas canales calcio, n (%)	36 (17,8)	9 (12,5)	0,295
Estatinas, n (%)	168 (82,4)	63 (87,5)	0,309
Antagonista aldosterona, n (%)	12 (5,9)	2 (2,8)	0,532

AntiH₂=antagonistas de los receptores H₂, ARAII=Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II, IBP=Inhibidores de la Bomba de Protones, IECA=Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina.

En la tabla 14 se describen las características angiográficas de la población, sin presentarse diferencias estadísticamente significativas entre los paciente pobre y normo respondedores.

Tabla 14. Datos angiográficos y función ventricular izquierda.

	Pobre-respondedores (n=206, 74,1%)	Normo-respondedores (n=72, 25,9%)	p valor
FEVI deprimida, n (%)	46 (24,3)	9 (13,8)	0,076
Nº vasos enfermos	1,4±1,1	1,4±1,0	0,345
TCI, n (%)	12 (5,8)	4 (5,7)	1
ADA o sus ramas, n (%)	115 (55,8)	38 (54,3)	0,823
ACX o sus ramas, n (%)	76 (36,9)	30 (42,9)	0,375
ACD o sus ramas, n (%)	109 (52,9)	28 (40,0)	0,062
Injertos, n (%)	6 (2,9)	1 (1,4)	0,683
Nº lesiones tratadas	1,1±0,8	1,2±1,1	0,594
Nº stents	1,2±1,0	1,3±1,3	0,442
≥ 1 Stent farmacoadactivo, n (%)	110 (69,6)	39 (73,6)	0,583
Longitud total, mm	29,0±17,2	29,9±21,1	0,765

ACD=Arteria Coronaria Derecha, ACX=Arteria Circunfleja, ADA=Arteria Descendente Anterior, FEVI= Función sistólica del ventrículo izquierdo, TCI=Tronco Coronario Izquierdo

Los pacientes pobre-respondedores presentaron mayor prevalencia del polimorfismo CYP2C19*2, además se observó una tendencia no significativa borderline hacia un mayor porcentaje de pacientes con el polimorfismo CYP2C9*2 entre aquellos normo-respondedores, para el resto de polimorfismos no hubo diferencias entre los pacientes con y sin PRC (tabla 15).

Tabla 15. Prevalencia de polimorfismos hepáticos relacionados con el metabolismo de clopidogrel.

	Pobre-respondedores (n=206, 74,1%)	Normo-respondedores (n=72, 25,9%)	p valor
CYP3A4 ≥ 1 alelo 1B, n (%)	19 (9,3)	4 (5,7)	0,354
CYP2C9 ≥ 1 alelo *2, n (%)	61 (30,7)	29 (42,6)	0,071
CYP2C9 ≥ 1 alelo *3, n (%)	35 (17,2)	10 (14,5)	0,596
CYP2C19 ≥ 1 alelo *17, n (%)	83 (40,3)	23 (31,9)	0,209
CYP2C19 ≥ 1 alelo *2, n (%)	63 (30,7)	13 (18,1)	0,038
PON1-Q192R ≥ 1 alelo C (R), n (%)	111 (54,1)	42 (58,3)	0,539

CYP = citocromo P450, PON1 = paraoxonasa 1

6.10. Análisis de regresión logística binaria no ajustada.

Adicionalmente, se realizó un análisis de regresión logística bivariante incluyendo las características basales, los factores de riesgo, comorbilidades (tabla 16), situación al ingreso (tabla 17), tratamiento con clopidogrel (tabla 18), tratamiento intrahospitalario concomitante (tabla 19), datos angiográficos (tabla 20) y los polimorfismos relacionados con el metabolismo del clopidogrel (tabla 21) para identificar los predictores (no ajustados) de elevada reactividad a clopidogrel.

Encontramos que la edad (OR 1,63 por cada desviación estándar; $p = 0,001$), la insuficiencia cardíaca (OR = 4,83; $p = 0,035$) y el ser portador de ≥ 1 alelo *2 del CYP2C19 (OR = 2,01; $p = 0,041$) fueron factores de riesgo para una elevada reactividad plaquetar. Fueron factores protectores el tabaquismo activo (OR = 0,41; $p = 0,002$), la hemoglobina (OR = 0,65; $p < 0,001$), el hematocrito (OR = 0,86; $p < 0,001$) y el aclaramiento renal estimado ($\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$, evaluado mediante la fórmula *Modification of Diet in Renal Disease*, $p = 0,015$).

Tabla 16. Análisis bivariante (características basales).

	OR no ajustado	IC 95%	p valor
Edad, por cada DE	1,63	1,24 – 2,15	0,001
Sexo femenino	1,32	0,72 – 2,40	0,371
IMC, kg/m ²	1,05	0,99 – 1,12	0,093
FACTORES DE RIESGO			
HTA	1,42	0,82 – 2,46	0,214
Dislipemia	1,08	0,63 – 1,85	0,791
Diabetes mellitus	1,27	0,73 – 2,22	0,404
Tabaquismo activo	0,41	0,23 – 0,72	0,002
COMORBILIDADES			
AF cardiopatía isquémica	0,51	0,21 – 1,24	0,136
Cardiopatía isquémica previa	1,11	0,64 – 1,91	0,712
ACTP previa	0,90	0,50 – 1,60	0,711
Bypass	1,05	0,28 – 3,99	0,942
Ictus	1,41	0,29 – 6,82	0,666
Arteriopatía periférica	0,60	0,17 – 2,11	0,423
EPOC	2,95	0,66 – 13,15	0,157
IRC	3,15	0,71 – 13,98	0,132

ACTP= Angioplastia coronaria transluminal percutánea, AF= Antecedentes familiares, DE= desviación estándar, EPOC= enfermedad pulmonar obstructiva crónica, HTA= hipertensión arterial, IC= intervalo de confianza, IMC= Índice de masa corporal, IRC= Insuficiencia renal crónica, OR= Odds ratio

Se presenta el odds ratio siendo la variable dependiente “pobre respuesta a clopidogrel”.

Tabla 17. Análisis bivariante (situación clínica al ingreso).

	OR no ajustado	IC 95%	p valor
KILLIP > I	4,83	1,12 – 20,95	0,035
Cambios ECG	1,18	0,68 – 2,04	0,559
Elevación troponinas	0,65	0,36 – 1,16	0,144
FEVI deprimida	2,00	0,92 – 4,36	0,081
DATOS DE LABORATORIO			
Hemoglobina, g/dL	0,65	0,54 – 0,77	<0,001
Hematocrito, %	0,86	0,80 – 0,92	<0,001
Plaquetas, por cada DE	1,23	0,93 – 1,62	0,154
Leucocitos, por cada DE	1,93	0,87 – 4,30	0,106
Creatinina, mg/dL	2,33	0,92 – 5,93	0,076
MDRD, ml/min/1,73m ²	0,99	0,98 – 1,00	0,015
Colesterol total, mg/dL	0,99	0,99 – 1,00	0,047
Colesterol HDL, mg/dL	0,99	0,96 – 1,01	0,263
Colesterol LDL, mg/dL	1,00	0,99 – 1,00	0,293
Triglicéridos, mg/dL	1,00	0,99 – 1,00	0,026

DE= desviación estándar, ECG= electrocardiograma, FEVI= Función sistólica del ventrículo izquierdo, HDL= lipoproteínas de alta densidad, IC= intervalo de confianza, LDL= lipoproteínas de baja densidad, MDRD= filtrado glomerular, OR= Odds ratio

Se presenta el odds ratio siendo la variable dependiente “pobre respuesta a clopidogrel”.

Tabla 18. Análisis bivariante (tratamiento con clopidogrel).

	OR no ajustado	IC 95%	p valor
Tiempo desde la primera dosis	0,99	0,98 – 1,02	0,846
Dosis de carga (300 ó 600mg)	0,85	0,45 – 1,61	0,621
Dosis de carga de 300 mg	0,80	0,47 – 1,37	0,412

IC= intervalo de confianza, OR= Odds ratio

Se presenta el odds ratio siendo la variable dependiente “pobre respuesta a clopidogrel”.

Tabla 19. Análisis bivariante (tratamiento médico intrahospitalario).

	OR no ajustado	IC 95%	p valor
AAS	1,93	0,32 – 11,81	0,475
Triflusal	0,52	0,09 – 3,19	0,482
ANTI H ₂	0,96	0,55 – 1,68	0,890
IBP	1,20	0,69 – 2,11	0,518
IECA y ARAII	0,67	0,34 – 1,29	0,227
Diuréticos	2,14	0,95 – 4,80	0,066
Alfa bloqueantes	0,70	0,17 – 2,86	0,616
Beta bloqueantes	0,79	0,41 – 1,51	0,477
Nitratos	1,08	0,61 – 1,90	0,801
Antagonistas canales calcio	1,52	0,69 – 3,33	0,298
Estatinas	0,67	0,30 – 1,46	0,312
Antagonista aldosterona	2,19	0,48 – 10,02	0,313

AAS=Ácido acetilsalicílico, AntiH₂=antagonistas de los receptores H₂, ARAII=Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II, IBP=Inhibidores de la Bomba de Protones, IC= Intervalo de confianza, IECA=Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina, OR= Odds ratio. Se presenta el odds ratio siendo la variable dependiente “pobre respuesta a clopidogrel”.

Tabla 20. Análisis bivariante (“datos angiográficos”).

	OR no ajustado	IC 95%	P valor
Nº vasos enfermos	1,14	0,87 – 1,48	0,344
TCI	1,02	0,32 – 3,27	0,973
ADA o sus ramas	1,06	0,62 – 1,84	0,823
ACX o sus ramas	0,78	0,45 – 1,35	0,376
ACD o sus ramas	1,69	0,97 – 2,92	0,063
Injerto	2,07	0,25 – 17,50	0,504
Nº lesiones tratadas	0,91	0,67 – 1,23	0,530
Nº stents	0,89	0,70 – 1,15	0,377
Longitud total	1,00	0,98 – 1,01	0,764

ACD=Arteria Coronaria Derecha, ACX=Arteria Circunfleja, ADA=Arteria Descendente Anterior, FEVI=Fracción de Eyección Ventricular Izquierda, IC= Intervalo de confianza, OR= Odds ratio, TCI=Tronco Coronario Izquierdo. Se presenta el odds ratio siendo la variable dependiente “pobre respuesta a clopidogrel”.

Tabla 21. Análisis bivariante (polimorfismos hepáticos relacionados con el metabolismo de clopidogrel).

	OR no ajustado	IC 95%	p valor
CYP2C9 \geq 1 alelo *2	0,59	0,34 – 1,05	0,072
CYP2C9 \geq 1 alelo *3	1,23	0,57 – 2,64	0,596
CYP3A4 \geq 1 alelo 1B	1,69	0,55 – 5,14	0,358
CYP2C19 \geq 1 alelo *2	2,01	1,03 – 3,93	0,041
CYP2C19 \geq 1 alelo *17	1,44	0,81 – 2,54	0,211
PON1 Q192R \geq 1 alelo C (R)	0,84	0,49 – 1,45	0,539

CYP = citocromo P450, IC= Intervalo de confianza, OR= Odds ratio, PON1 = paraoxonasa 1. Se presenta el odds ratio siendo la variable dependiente “pobre respuesta a clopidogrel”.

6.11. Análisis multivariado

En un modelo de regresión logística multivariable correctamente calibrado que incluyó como covariables la edad, sexo, IMC, diabetes, tabaquismo activo, insuficiencia cardiaca, infarto agudo de miocardio, hemoglobina basal, aclaramiento renal estimado, medicación concomitante (antagonistas del calcio y estatinas) y los seis polimorfismos (tabla 22), resultaron predictores independientes de riesgo de PRC, la edad (OR = 1,43 por cada desviación estándar; IC 95% 1,03-2,00), el IMC (OR = 4,03 por cada desviación estándar; IC 95% 1,21-13,43) y el ser portador de \geq 1 alelo *1B del CYP3A4 (OR = 4,05; IC 95% 1,01-16,34) mientras que fue protector la hemoglobina basal elevada. El género femenino, que resultó protector (OR = 0,44, IC 95% 0,20-1,00), tuvo significación borderline. La evaluación del score ji-cuadrado, para entender la importancia relativa de cada covariable, informó que (en orden de importancia) la variable más relevante del modelo fue la hemoglobina, seguida de la edad, el CYP2C9*2, CYP2C19*2 y CYP3A4*1B.

Tabla 22. Modelo multivariado clínico-genético de predicción de PRC.

	OR	IC 95%	p valor	ji ²
VARIABLES CLÍNICAS §				
Edad, por cada DE	1,43	1,03 – 2,00	0,034	11,28
Sexo femenino	0,44	0,20 – 1,00	0,050	0,31
IMC, por cada DE	4,03	1,21 – 13,43	0,024	1,43
Hemoglobina, g/dL†	1 x e ⁻¹⁸	1 x e ⁻²⁶ – 1 x e ⁻¹⁰	<0,001	23,17
Estatinas concomitantes‡	0,43	0,17 – 1,09	0,074	0,64
VARIABLES GENÉTICAS				
CYP3A4 ≥ 1 alelo 1B	4,05	1,01 – 16,34	0,049	1,72
CYP2C9 ≥ 1 alelo *2	0,62	0,32 – 1,23	0,170	3,94
CYP2C9 ≥ 1 alelo *3	1,35	0,55 – 3,35	0,517	0,26
CYP2C19 ≥ 1 alelo *2	2,03	0,92 – 4,50	0,081	2,77
CYP2C19 ≥ 1 alelo *17	1,73	0,83 – 3,59	0,145	1,61
PON1 Q192R ≥ 1 alelo C	0,54	0,18 – 1,67	0,287	1,54

†Variable transformada mediante el logaritmo de base decimal.

‡ 91,3% son atorvastatina.

§ ajustado por tabaquismo activo, diabetes, insuficiencia cardiaca, infarto agudo de miocardio, aclaramiento renal estimado y antagonistas del calcio concomitantes.

CYP = citocromo P450, IC= intervalo de confianza, IMC= índice de masa corporal, DE= desviación estándar, OR = Odds Ratio, PON1 = paraoxonasa 1

Calibración del modelo: Prueba de Hosmer-Lemeshow: ji²=4,256; gl=8; p valor=0,833. Se presenta el odds ratio siendo la variable dependiente “pobre respuesta a clopidogrel”.

6.11.1. Discriminación de pobre respuesta a clopidogrel: variables clínicas y genéticas.

El estadístico C del modelo clínico presentado más arriba fue de 0,749 (IC 95% 0,683-0,815) y el del modelo que incluye adicionalmente a CYP3A4*1B es 0,763 (IC 95% 0,699-0,826, p para la comparación de áreas = 0,088).

Por otro lado, el estadístico C del modelo que incluye las variables clínicas y los seis polimorfismos es 0,788 (IC 95% 0,729-0,847; p para la comparación de áreas frente al modelo clínico = 0,028) (figura 20).

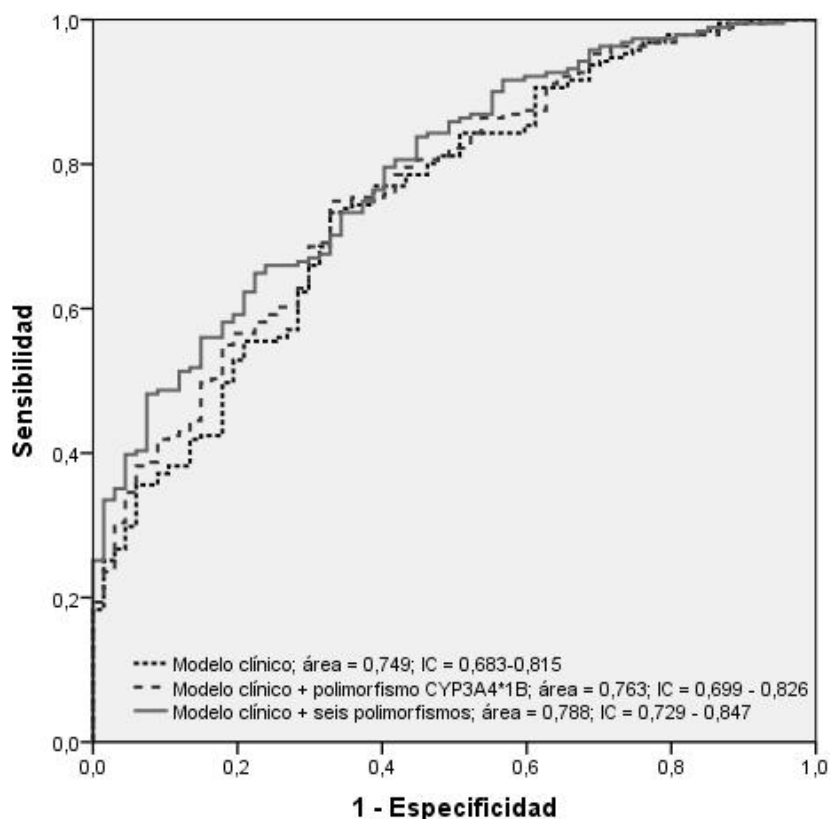


Figura 20. Curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC) para el modelo clínico, el modelo con variables clínicas y CYP3A4*1B y el modelo con variables clínicas y los seis polimorfismos. IC: Intervalo de confianza.

6.12. Relación con el infarto peri-angioplastia coronaria.

De los 212 pacientes sometidos a ICP, registramos 34 (16,0%) casos de infarto peri-angioplastia. No hubo diferencias entre los pacientes con y sin PRC [26 (18,6%) vs 8 (15,4%), $p=0,607$].

De igual forma, no se observaron diferencias en la aparición de infarto peri-angioplastia, según el genotipo (tabla 23).

Tabla 23. Distribución de polimorfismos en relación con la aparición de infarto peri-angioplastia.

	IAM peri-angioplastia		p valor
	SI (n=34; 16,0%)	NO (n=178; 84,0 %)	
CYP3A4 ≥ 1 alelo 1B, n (%)	3 (8,8)	16 (9,1)	0,627
CYP2C9 ≥ 1 alelo *2, n (%)	8 (24,2)	61 (35,1)	0,227
CYP2C9 ≥ 1 alelo *3, n (%)	7 (21,2)	27 (15,4)	0,410
CYP2C19 ≥ 1 alelo *2, n (%)	11 (32,4)	39 (21,9)	0,189
CYP2C19 ≥ 1 alelo *17, n (%)	16 (47,1)	68 (38,2)	0,333
PON1-Q192R ≥ 1 alelo C, n (%)	18 (52,9)	105 (59,3)	0,489

CYP = citocromo P450, PON1 = paraoxonasa 1

6.13. Episodios adversos durante el seguimiento

Durante el seguimiento, de los 213 (76,6%) pacientes a los que se prescribió clopidogrel al alta, observamos un total de 19 episodios adversos. Se registraron 8 anginas inestables, 4 trombosis del stent, 3 reinfartos, 2 accidentes cerebrovasculares y 2 muertes por cualquier causa. La aparición de eventos adversos en el grupo de pacientes pobre-respondedores fue superior que en el de normo-respondedores aunque sin presentar diferencias significativas (tabla 24). La mediana de seguimiento para los pacientes sin eventos fue de 10,7 meses (rango intercuartílico 3,7-14,3).

Tabla 24. Eventos adversos tras el alta hospitalaria.

	Pacientes con clopidogrel al alta (n=213)	Pobre-respondedores (n=156, 73,2%)	Normo-respondedores (n=57, 26,8%)	Log-rank p valor
Muerte por cualquier causa, n (%)	2 (0,9)	2 (1,3)	0	0,537
Infarto de miocardio no fatal, n (%)	3 (1,4)	3 (1,9)	0	0,393
Angina inestable, n (%)	8 (3,8)	6 (3,9)	2 (3,5)	0,638
Trombosis del stent, n (%)	4 (1,9)	3 (1,9)	1 (1,8)	0,711
ACV, n (%)	2 (0,9)	2 (1,3)	0	0,537
Total, n (%)	19 (8,9)	16 (10,3)	3 (5,3)	0,261

ACV= Accidente Cerebrovascular

No se observaron diferencias significativas en la aparición de eventos adversos tras el alta según el genotipo (tabla 25).

Tabla 25. Distribución de polimorfismos en relación con eventos adversos tras el alta.

	Evento		p valor
	SI (n=19, 8,9%)	NO (n=194, 91,1%)	
CYP3A4 ≥ 1 alelo 1B, n (%)	1 (5,3)	14 (7,9)	0,560
CYP2C9 ≥ 1 alelo *2, n (%)	4 (21,1)	59 (33,9)	0,257
CYP2C9 ≥ 1 alelo *3, n (%)	4 (21,1)	27 (15,4)	0,359
CYP2C19 ≥ 1 alelo *2, n (%)	5 (26,3)	46 (25,6)	0,566
CYP2C19 ≥ 1 alelo *17, n (%)	11 (57,9)	66 (36,7)	0,071
PON1-Q192R ≥ 1 alelo C, n (%)	10 (52,6%)	101 (56,4)	0,751

CYP = citocromo P450, PON1 = paraoxonasa 1

En un análisis de Kaplan-Meier, los pacientes pobre-respondedores presentaron 16 episodios (10,3%) frente a 3 (5,3%) en los normo-respondedores (log-rank, p=0,275) (figura 21).

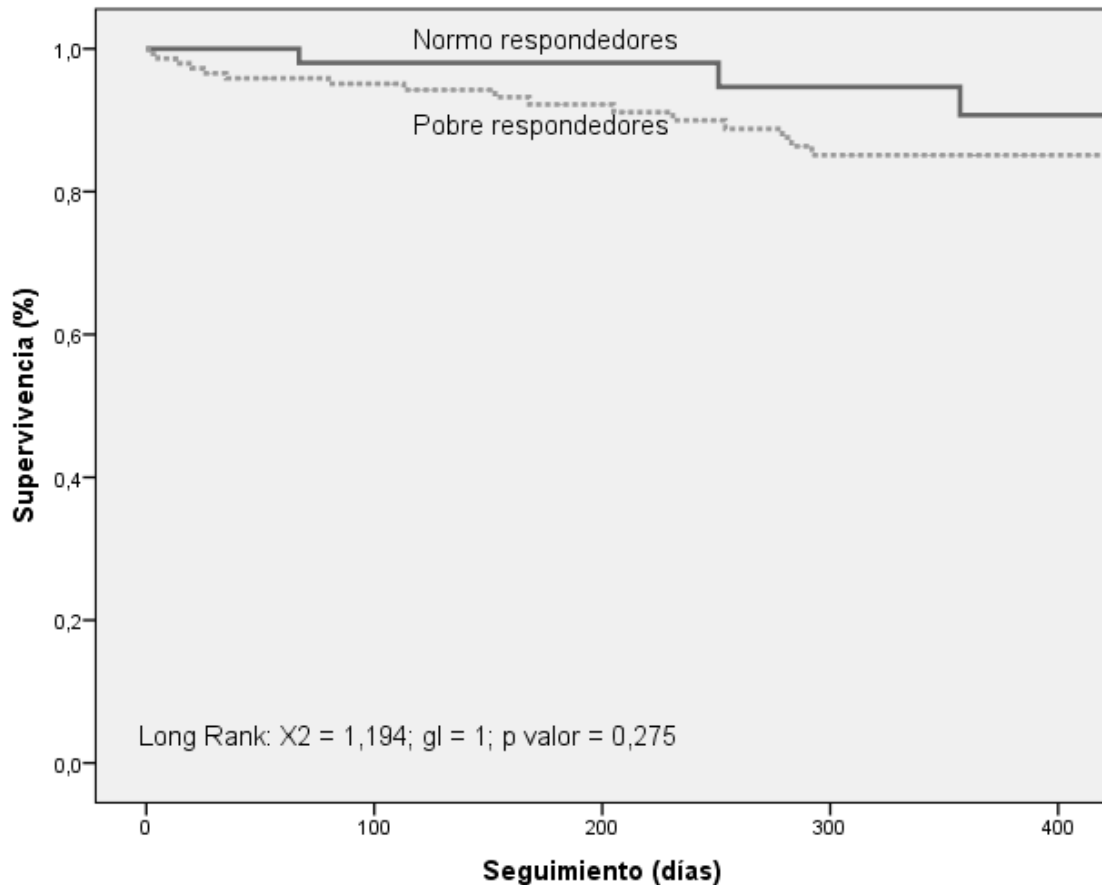


Figura 21. Método de supervivencia de Kaplan Meier.

Los pacientes portadores de al menos un alelo *1B de CYP3A4 presentaron 1 evento (5,9%) frente a 18 (9,2%) los no portadores (log-rank, $p=0,603$). Los pacientes portadores de al menos un alelo *2 de CYP2C9 presentaron 4 eventos (6,0%) frente a 15 (10,3%) de los no portadores (log-rank, $p=0,383$). Los pacientes portadores de al menos un alelo *3 de CYP2C9 presentaron 4 eventos (11,8%) frente a 15 (8,4%) de los no portadores (log-rank, $p=0,725$). Los pacientes portadores de al menos un alelo *2 de CYP2C19 presentaron 5 eventos (8,8%) frente a 14 (9,0%) de los no portadores (log-rank, $p=0,941$). Los portadores de al menos un alelo *17 de CYP2C19 presentaron 11 eventos (13,8%) frente a 8 (6,0%) de los no portadores (log-rank, $p=0,027$). Los portadores de al menos un alelo C (R) de PON1 presentaron 10 eventos (8,3%) frente a 9 (9,8%) de los no portadores (log-rank, $p=0,763$).

Discusión

7. Discusión

A pesar de que la doble antiagregación plaquetaria con clopidogrel y aspirina sigue siendo la terapia más comúnmente prescrita en pacientes con SCA, la variabilidad interindividual en la respuesta a este tratamiento ha sido y sigue siendo objeto de múltiples estudios. La influencia de los factores genéticos se ha sumado a los factores clínicos como probable origen de la variabilidad de la respuesta a clopidogrel. La controversia sigue abierta.

Los resultados de nuestro estudio muestran por primera vez que, en pacientes con SCA, la presencia de al menos un alelo *1B del CYP3A4 puede influir de forma independiente en la respuesta plaquetar a clopidogrel. Sin embargo, la importancia relativa de los seis polimorfismos así como de CYP3A4*1B como predictores de respuesta a clopidogrel es modesta comparada con variables puramente clínicas o rutinarias de laboratorio, de fácil obtención, tales como la edad, sexo, IMC y la hemoglobina basal, como sugirió el análisis de la discriminación y el examen del score ji-cuadrado.

Son pocos los estudios previos que han evaluado el impacto del polimorfismo CYP3A4*1B sobre la reactividad plaquetar (90,138,149,157,159–161). De éstos, sólo uno (160) ha evaluado el valor pronóstico de CYP3A4*1B en pacientes con SCA en unas condiciones similares a las nuestras y con resultado negativo. Se trata de un estudio que evaluó la influencia de tres polimorfismos (CYP3A4*1B, CYP3A5*3 y CYP2C19*2) en pacientes con SCASEST. Sin embargo, resulta llamativo que en este estudio el análisis multivariable para la predicción de la reactividad plaquetar se realizó ajustando únicamente por edad y sexo. Por el contrario, en nuestro estudio el modelo multivariable se ajustó cuidadosamente por edad, sexo, IMC, diabetes, tabaquismo activo, insuficiencia cardiaca, infarto de miocardio, hemoglobina basal, aclaramiento renal estimado, medicación

concomitante y los seis polimorfismos. Estas sustanciales diferencias en el ajuste estadístico pueden haber tenido un papel en la discordancia de los hallazgos.

Algunos trabajos han demostrado que otros polimorfismos de CYP3A4 influyen en la respuesta a clopidogrel (61,157). El estudio de Park et al. (61) que evaluó la influencia de 9 polimorfismos implicados en el metabolismo de clopidogrel en pacientes sometidos a ICP, observó que el polimorfismo IVS + 12G>A (rs2242480) del CYP3A4 se relaciona con la variabilidad en la reactividad plaquetar, concluyendo que los pacientes portadores de los genotipos GA o AA tienen valores más elevados de reactividad plaquetar que los portadores del genotipo salvaje GG (254±8 PRU vs. 281±10 PRU, p=0,038). Por el contrario, los estudios de Giusti et al. (173) en casi 1500 pacientes diagnosticados de SCA, y de Fontana et al. (184) en sujetos sanos, no encontraron asociación entre este polimorfismo y la reactividad plaquetar; mientras que Angiolillo (157) evaluó la contribución de 5 polimorfismos de CYP3A4 en la variabilidad interindividual en la respuesta a clopidogrel en pacientes con enfermedad coronaria estable. A diferencia del estudio de Park, el polimorfismo IVS + 12G>A se relacionó con una mejor respuesta a clopidogrel. En este trabajo, el polimorfismo CYP3A4*1B no pudo ser considerado para el análisis por su baja prevalencia en la población estudiada (3%) que sólo incluía 82 pacientes.

La asociación del polimorfismo *1B de CYP3A4 con la respuesta a clopidogrel tampoco se ha podido confirmar en otros estudios. En el trabajo de Gladding et al. (159), que se llevó a cabo en pacientes sometidos a intervencionismo coronario “electivo”, no se encontraron portadores del polimorfismo CYP3A4*1B probablemente debido al escaso número de pacientes estudiados (n=60). Es importante señalar que, en nuestra población, la

distribución de los genotipos tanto para CYP3A4 como para los otros cinco polimorfismos (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*17, PON1-Q192R) presenta frecuencias similares a los estudios llevados a cabo en población caucásica (138,144,148,153,164,168,185).

El pequeño tamaño muestral (n=89) también puede ser responsable de no encontrar relación entre el polimorfismo CYP3A4*1B y una menor respuesta a clopidogrel en el estudio de Brandt et al. (161) que por otra parte se realizó en sujetos sanos.

En consonancia con nuestros resultados se encuentran los del estudio de Harmsze et al. (138). En este trabajo se evaluó la influencia de 9 polimorfismos en la función plaquetaria en pacientes sometidos a intervencionismo coronario “electivo” y se observó que los portadores de al menos un alelo *1B de CYP3A4 presentaron valores superiores, aunque no de forma significativa, de reactividad plaquetaria, medida con VerifyNow P2Y₁₂, en comparación con los pacientes con genotipo salvaje, especialmente en los pacientes en tratamiento crónico con clopidogrel (193,6±53,0 PRU frente a 177,4±70,9 PRU).

Sin embargo, nuestros resultados no se pueden comparar con los de Harmsze (149), Bouman (163) o Geisler (90). El primero analizó la influencia del polimorfismo CYP3A4*1B aunque con un diseño de casos y controles en pacientes con antecedentes de trombosis del stent, sin encontrar diferencias en el número de pacientes portadores de al menos un alelo *1B de CYP3A4 entre casos y controles (149). El segundo se trata de un estudio de caso-cohortes realizado en pacientes con enfermedad arterial coronaria sometidos a ICP y en él se observó que los polimorfismos CYP3A4*1B y CYP2C19*2 no resultaron factores relacionados con la aparición de trombosis del stent, siendo el PON1-

Q192R el único factor genético relacionado (163). Por último, el tercero comparó la frecuencia de los alelos entre pacientes con enfermedad arterial coronaria y sujetos sanos sin encontrar relación entre el genotipo de CYP3A4*1B y la agregación plaquetaria residual (90). Por el contrario, nuestro estudio se ha realizado en una población relativamente homogénea de pacientes con SCA remitidos para cateterismo cardiaco.

Varios estudios han relacionado la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 con valores más elevados de reactividad plaquetar (186) y un aumento del riesgo de eventos cardiovasculares (47,142,187), aunque esta relación no es defendida por todos los investigadores (144,188). En nuestro trabajo, el polimorfismo CYP2C19*2 resultó ser un factor de riesgo no ajustado para una elevada reactividad plaquetar. Sin embargo, en el modelo multivariante no fue un predictor independiente de PRC aunque presentó el segundo score ji-cuadrado más elevado de las variables genéticas. Nuestros resultados entran en contraposición con los de Park (61), que analizó la relación de una batería de variables clínicas y nueve polimorfismos -entre los que no se incluía CYP3A4*1B- con una elevada reactividad plaquetar. En este estudio, la única variable genética que resultaba factor predictor fue CYP2C19*2, aunque este polimorfismo sólo explicaba el 4,5% de la variabilidad en la respuesta a clopidogrel mientras que el modelo que incluía variables clínicas y genéticas explicaba un 12,8% de la variabilidad (61).

En el estudio de Bouman et al. (189) realizado en 1024 pacientes que fueron sometidos a intervencionismo coronario electivo, los pacientes heterocigotos y homocigotos para CYP2C19*2 presentaron valores más elevados de reactividad plaquetar, medida con tres métodos diferentes (agregometría óptica, PlateletWorks y VerifyNow P2Y12), en comparación con los pacientes con genotipo salvaje. Sin embargo, ser portador de al

menos un alelo *2 de CYP2C19 sólo podía explicar un 3,7% de la variabilidad de la reactividad plaquetar medida con VerifyNow P2Y₁₂, cifra que aumentaba hasta un 20,6% tras introducir las variables clínicas.

Por el contrario, trabajos como el de Paré et al. (188) sí están en consonancia con nuestros resultados. Este estudio, que incluyó a más de 5000 pacientes pertenecientes a los ensayos ACTIVE-A (*“Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events”*) y CURE, comparó la eficacia de clopidogrel frente a placebo en la reducción de eventos cardiovasculares en pacientes con fibrilación auricular y SCA, respectivamente. Los resultados mostraron que el riesgo de eventos cardiovasculares era menor en el grupo de clopidogrel que en el de placebo, siendo similar entre los portadores, homocigotos y heterocigotos, de los alelos *2 y *3 de CYP2C19 y los no portadores. Sin embargo, este hallazgo puede deberse al bajo porcentaje de pacientes sometidos a ICP con colocación de stent, ya que la mayor parte los estudios previos (142,145,190) muestran un mayor riesgo de trombosis del stent en los portadores del alelo *2 de CYP2C19.

A su vez, en el estudio de Tello-Montoliu et al. (144) se midió la reactividad plaquetar en pacientes con SCA mediante dos técnicas, agregometría de transmisión óptica y pruebas de fosfoproteínas estimulada por vasodilatadores (VASP). La determinación de los valores de VASP es un indicador de la reactividad P2Y₁₂ y, por tanto, de la inhibición inducida por clopidogrel que se cuantifican con el índice de reactividad plaquetaria mediante citometría de flujo. Con la agregometría de transmisión óptica no se observaron diferencias en la reactividad plaquetar entre portadores y no portadores del alelo *2 de CYP2C19. Sin embargo, con la determinación de VASP, los pacientes portadores de CYP2C19*2 mostraron un aumento del índice de reactividad plaquetar, aunque el polimorfismo

CYP2C19*2 no se pudo asociar con una peor evolución durante el periodo de seguimiento de 6 meses.

De modo similar, en el metaanálisis de Zabalda et al. (191) se observó que el polimorfismo CYP2C19*2 se relacionaba con un mayor riesgo de trombosis del stent pero no con un mayor riesgo de eventos adversos. Se encontró que la asociación entre CYP2C19*2 y los eventos adversos cardiovasculares se ponía de manifiesto en los estudios de menos de 500 pacientes pero no en los de mayor tamaño muestral, en los que no se observaba esta asociación, poniendo sobre la mesa un potencial sesgo de publicación en estudios “pequeños”.

En nuestro trabajo, a excepción del CYP3A4*1B, el resto de variables genéticas estudiadas, incluida el CYP2C9*2, no se relacionaron con una mayor reactividad plaquetar. Estos resultados se encuentran en consonancia con estudios previos. Los estudios de Trenk et al. (168) y Paré et al. (166) analizaron el efecto de PON1-Q192R sin encontrar relación entre este polimorfismo y el efecto antiagregante plaquetario de clopidogrel. A su vez, en el estudio de Miura et al. (140) se observó que los polimorfismos PON1-Q192R y CYP2C9*3 no se relacionaban con una mayor reactividad plaquetar a pesar de tratamiento, aunque sí con el alelo *2 de CYP2C19. Lo mismo ocurría en los estudios de Gladding et al. (159) y Liang et al. (142) en los que no se encontraba esta asociación con CYP2C9*2 y CYP2C19*17, respectivamente, aunque sí para el polimorfismo CYP2C19*2.

En cuanto a las variables clínicas, en el análisis multivariado de Park et al. (61), la edad avanzada, el género femenino, la hipertensión, la diabetes mellitus y la insuficiencia renal

crónica se relacionaron con elevada reactividad plaquetar. En nuestra serie, los pacientes que presentaron una mayor reactividad plaquetar tenían una edad avanzada, presentaban anemia y mayor IMC lo que también está en consonancia con estudios previos (48,61,64,189,192,193). El estudio de Park (61) no tenía en cuenta los valores de IMC y de hemoglobina basal ni en el análisis univariado ni en el multivariado. Por su parte, aunque algunos estudios han relacionado la presencia de diabetes mellitus con una PRC (82,194), en nuestro estudio, el hallazgo de no asociación entre ambas es consistente con publicaciones previas (67,150).

Otras variables que se han relacionado en estudios previos con la variabilidad interindividual en la respuesta a clopidogrel son la insuficiencia renal y el tabaquismo (82,88,194). En nuestro estudio, aunque el aclaramiento renal estimado resultó factor de riesgo de elevada reactividad plaquetar (no ajustado) y el tabaquismo factor protector (no ajustado), en el modelo multivariante no fueron predictores independientes de PRC, al igual que en el estudio previos (189).

En relación con las interacciones farmacológicas, la interacción entre el clopidogrel y el omeprazol es uno de los temas más controvertidos, en algunos estudios se ha encontrado una relación directa entre el aumento del riesgo cardiovascular y el uso conjunto de clopidogrel y omeprazol (88,195), mientras que otros trabajos no apoyan esta interacción (107,193,196–199). Estos últimos no encuentran diferencias en los valores de porcentaje de inhibición y de reactividad plaquetar entre los pacientes con y sin tratamiento con IBP (193,196), en el riesgo de mortalidad (197), o el riesgo de reingresos hospitalario por recidiva de SCA en los pacientes en tratamiento con omeprazol (198). Tampoco se encontró relación entre el tratamiento concomitante con IBP y clopidogrel o prasugrel y un

mayor riesgo de muerte, infarto o accidente cerebrovascular en el estudio TRITON-TIMI 38 (200) que incluyó más de 13.000 pacientes con SCA.

Durante el seguimiento intrahospitalario que se realizó en nuestro estudio se registraron 35 casos de infarto peri-procedimiento que no se relacionaron con la PRC ni con el genotipo de los pacientes. Estos resultados contradicen a los de Mangiacapra et al. (71) que observaron una mayor incidencia de infarto de miocardio peri-procedimiento en los sujetos con elevada reactividad plaquetaria en un estudio realizado en 250 pacientes sometidos a ICP, aunque esto puede estar relacionado con la mayor incidencia de eventos intrahospitalarios (23%) observados en ese estudio con respecto al nuestro (16%), en relación con una diferente definición del evento, algo que ha sufrido múltiples modificaciones en los últimos años.

En cuanto al seguimiento al alta hospitalaria, los pacientes pobre-respondedores presentaron más eventos que los normo-respondedores (10,3% frente a 5,3%) aunque sin presentar diferencias significativas, esto puede deberse al escaso número de eventos adversos como ha ocurrido en estudios previos (144,194).

Por otra parte, nuestros resultados muestran una elevada prevalencia de PRC que, aunque está en línea con algunos trabajos anteriores (67,144,196,201), pudo estar relacionado con la inclusión de pacientes con SCA con elevación del ST -expuestos un menor tiempo a clopidogrel- y la decisión por parte del grupo investigador de elegir un punto de corte de 208 unidades PRU, el cual es manifiestamente más bajo que en otros estudios anteriores (36,47,61,70), aunque basado en las recomendaciones recientes del fabricante (176).

Varios autores recomiendan el actual punto de corte de 208 PRU para definir la pobre respuesta a clopidogrel (79,80), y en los últimos estudios realizados es el más extendido (202,203). Los trabajos que utilizan este punto de corte presentan un elevado porcentaje de pacientes con PRC (72,75,76,115) lo que está en consonancia con nuestros resultados.

Otro factor que puede haber influido en la elevada proporción de pacientes con PRC fue la adopción del criterio de inclusión basado en una duración del tratamiento con clopidogrel igual o superior a 12 horas desde la dosis de carga. Esta decisión estuvo fundamentada en estudios farmacocinéticos previos que indican que el estado de equilibrio (“*steady state*”) para clopidogrel podría alcanzarse entre 4 y 6 horas después de la dosis inicial de carga (204), con un porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria del 80% a las 5 horas (205).

Aunque existe una experiencia muy limitada, algunos autores (185,206) ya están investigando la potencial utilidad de la determinación de ciertos polimorfismos mediante sistemas a la cabecera del enfermo (“*point of care*”) en la toma de decisiones respecto de la antiagregación óptima en la fase inicial de la atención al paciente con SCA. Ciertos estudios piloto (185,206) sugieren que estas determinaciones pueden ayudar a identificar pacientes que se beneficien de una segunda dosis de carga de clopidogrel o bien de un antiagregante más potente.

En este sentido, VerifyNow[®] es un sistema rápido, fiable y fácil de utilizar que puede ser una buena opción para detectar aquellos pacientes con pobre respuesta a clopidogrel antes de una ICP e individualizar su tratamiento. Esta terapia individualizada podría ser un incremento de dosis o un cambio de antiagregante plaquetario.

Algunos trabajos han evaluado el resultado de incrementar la dosis de clopidogrel (73). En el estudio EFFICIENT (“*the EFFect of hIgh-dose CloPIdogrel treatmENT*”) (207) se analizó el efecto de doblar la dosis de mantenimiento de clopidogrel sobre el desarrollo de eventos adversos cardiovasculares o cerebrovasculares tras una ICP en pacientes con resistencia a clopidogrel. Los pacientes se clasificaron en tres grupos: pacientes respondedores que recibieron 75 mg de clopidogrel diarios, pacientes resistentes que recibieron 75 mg diarios y pacientes resistentes que recibieron 150 mg diarios. Durante el periodo de seguimiento de 6 meses se observó que los pacientes no respondedores que recibieron la dosis estándar de clopidogrel presentaron incidencias significativamente más altas de eventos adversos cardiovasculares y cerebrovasculares que los otros dos grupos de pacientes. Además, el aumento de la dosis de mantenimiento no se relacionó con un aumento en el riesgo de hemorragias.

A pesar de esto, la estrategia de aumentar la dosis de clopidogrel no mostró un efecto beneficioso en los pacientes de bajo riesgo sometidos a ICP del estudio GRAVITAS (“*Gauging Responsiveness with A Verifynow assay-Impact on Thrombosis And Safety*”) (208). En este trabajo se comparó una dosis de carga adicional de 600 mg seguida de 150 mg diarios frente a 75 mg diarios de clopidogrel en pacientes no respondedores sometidos a ICP sin que se observaran diferencias en la incidencia de muerte de origen cardiovascular, infarto de miocardio o trombosis del stent entre los pacientes que recibieron la dosis de 75 mg y la de 150 mg de clopidogrel.

Una alternativa sería el empleo de un fármaco antiagregante plaquetario más potente, como los nuevos agentes antiplaquetarios prasugrel o ticagrelor, que no se afectan por la genética

del CYP, en pacientes en los que la respuesta a clopidogrel está disminuida o en aquellos con elevado riesgo trombótico y moderado o bajo riesgo hemorrágico.

El prasugrel es una tienopiridina de tercera generación que inhibe de forma específica e irreversible el receptor P2Y₁₂ de las plaquetas. Es un profármaco que se administra por vía oral, aunque por su estructura química se convierte en metabolito activo de forma menos dependiente de los citocromos que el clopidogrel, por lo que se absorbe y se metaboliza más rápido consiguiendo una inhibición más rápida y potente que con clopidogrel (209). Por otra parte, no existe evidencia de que su efecto antiagregante se vea modificado por polimorfismos genéticos o el uso concomitante con IBP.

El prasugrel resultó superior al clopidogrel en el estudio TRITON-TIMI 38 (210) para el objetivo combinado de infarto de miocardio, ictus isquémico, trombosis del stent y mortalidad cardiovascular aunque no redujo la mortalidad global. Sin embargo, en comparación con el clopidogrel, el prasugrel aumentaba el riesgo de hemorragias mayores, así como las hemorragias potencialmente fatales y hemorragias mortales.

El ticagrelor es una ciclopentiltriazolopirimidina, de administración oral que no requiere biotransformación hepática e inhibe de forma reversible el receptor P2Y₁₂ plaquetar. Presenta un inicio de acción más rápido y una potencia superior en la inhibición de la función plaquetar que el clopidogrel y su efecto es reversible en 48 horas.

El ticagrelor resultó superior al clopidogrel en el estudio PLATO (211) para el objetivo combinado de muerte cardiovascular, infarto de miocardio o ictus, así como la mortalidad

total, sin presentar un aumento de hemorragias mayores, aunque se presentaron más hemorragias intracraneales en el grupo de ticagrelor.

En un estudio que evaluó la influencia del alelo CYP2C19*2 sobre la reactividad plaquetar en pacientes tratados con clopidogrel, prasugrel o ticagrelor se observó que los beneficios de prasugrel y ticagrelor comparados con los de clopidogrel son más pronunciados en los portadores del alelo *2 de CYP2C19. Este trabajo concluyó que el genotipado de CYP2C19 puede ayudar a identificar a los pacientes pobre-respondedores que se pueden beneficiar de un cambio de tratamiento antiagregante (185).

Por otra parte, en un reciente análisis farmacoeconómico que evaluó el coste-utilidad de la terapia individualizada guiada por genotipo, comparando el tratamiento con clopidogrel, con prasugrel y la terapia guiada por genotipo (clopidogrel en los pacientes con el genotipo salvaje para CYP2C19 y prasugrel en los pacientes con las variantes de pérdida de función de este genotipo), se observó que la individualización del tratamiento era la estrategia más coste-efectiva en pacientes con SCA que se someten a una ICP (212).

El cambio de tratamiento de clopidogrel a prasugrel o ticagrelor en pacientes de bajo riesgo posiblemente no reduciría el riesgo de complicaciones trombóticas pero elevaría el riesgo de hemorragias, por lo que la individualización del tratamiento sugiere que el beneficio es más probable en los pacientes de alto riesgo, reduciendo las tasas de eventos adversos cardiovasculares a costa de un ligero mayor riesgo de hemorragia.

La variabilidad de la respuesta a clopidogrel en pacientes con SCA ha sido ampliamente estudiada. Por este motivo, conocer la respuesta funcional de las plaquetas puede ayudar en

el manejo de los pacientes. Por otra parte, el análisis farmacogenético para el clopidogrel podría ser de utilidad en pacientes seleccionados, como los que van a ser sometidos a ICP y presentan mayor riesgo de trombosis. Un aspecto clave del estudio farmacogenético es el tiempo de respuesta. Es importante destacar que el componente genético es solo uno de los factores que modifican la respuesta farmacológica a clopidogrel, y que la prevención de eventos cardiovasculares en pacientes que reciben agentes antiplaquetarios debe basarse en la evaluación global de los factores de riesgo, más que en un único estudio genético.

7.1. Limitaciones.

En primer lugar, el tamaño muestral del estudio fue limitado y vino determinado por el número máximo de sujetos que se pudieron reclutar en el intervalo de tiempo señalado, dentro de su naturaleza exploratoria. Por otro lado, aunque poco probable, la baja prevalencia del alelo *1B de CYP3A4 puede haber tenido un impacto en los hallazgos. Sin embargo, la prevalencia alélica fue muy similar a la de otros estudios (160,161) y estuvo en concordancia con la ley de Hardy-Weinberg (160) y el número de covariables del modelo ajustado tuvo una relación superior a 10 respecto de la variable dependiente. Otra potencial limitación supone la determinación de la reactividad plaquetar en un solo momento temporal. Como fortalezas, señalamos que es un estudio que evalúa seis polimorfismos de nucleótido simple así como un conjunto detallado de variables clínicas en una población de pacientes con SCA.

Conclusiones

Respecto del objetivo principal

En la identificación del paciente con pobre respuesta a clopidogrel, el conjunto de seis polimorfismos estudiados (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*17, PON1-Q192R, CYP3A4*1B) aporta información de forma significativa más allá de la aportada por un conjunto de variables clínicas. El polimorfismo CYP3A4*1B se relaciona con una elevada reactividad plaquetar a pesar de tratamiento.

Respecto del objetivos secundarios

1. La prevalencia de elevada reactividad plaquetaria a pesar del tratamiento con clopidogrel es elevada (74,1%).
2. El perfil del paciente con elevada reactividad plaquetar se corresponde con sujetos mayores, con un índice de masa corporal elevada, niveles reducidos de hemoglobina y portadores de al menos un alelo *1B de CYP3A4.
3. La variabilidad de la respuesta a clopidogrel explicada por las variables genéticas es modesta comparativamente con las variables clínicas.
4. Ninguno de los polimorfismos condicionaron un pronóstico distinto en pacientes con diagnóstico de SCA remitidos para cateterismo cardiaco.
5. La elevada reactividad plaquetar a pesar de tratamiento no se relacionó con una mayor aparición de eventos adversos.

Bibliografía

Bibliografía

1. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9064):1498–504.
2. Instituto Nacional de Estadística. Disponible en: <http://www.ine.es/inebmenu/indice.htm>.
3. Barrabés Riu JA. Retos actuales en el diagnóstico y manejo del SCA en España. 1 ed. Sociedad Española de Cardiología. 2013.
4. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, et al. Guía de práctica clínica de la ESC 2013 sobre diagnóstico y tratamiento de la cardiopatía isquémica estable. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67(2):135.e1–e81.
5. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison: Principios de medicina interna. 18 ed. Mc Graw Hill. Madrid. 2012.
6. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, et al. Guía de práctica clínica de la ESC para el manejo del síndrome coronario agudo en pacientes sin elevación persistente del segmento ST. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65(2):173.e1-e55.
7. Camm J, Lüscher TF, Serruys PW. The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine. 2 ed. Oxford Univ Press. 2009.
8. Yeh RW, Sidney S, Chandra M, Sorel M, Selby JV, Go AS. Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2010;362(23):2155–65.
9. Terkelsen CJ, Lassen JF, Nørgaard BL, Gerdes JC, Jensen T, Gøtzsche LB, et al.

- Mortality rates in patients with ST-elevation vs. non-ST-elevation acute myocardial infarction: observations from an unselected cohort. *Eur Heart J.* 2005;26(1):18–26.
10. Fox KA, Eagle KA, Gore JM, Steg PG, Anderson FA, GRACE and GRACE2 investigators. The Global Registry of Acute Coronary Events, 1999 to 2009--GRACE. *Heart.* 2010;96(14):1095–101.
 11. Steg PG, Goldberg RJ, Gore JM, Fox KA, Eagle KA, Flather MD, et al. Baseline characteristics, management practices, and in-hospital outcomes of patients hospitalized with acute coronary syndromes in the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am J Cardiol.* 2002;90(4):358–63.
 12. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(10):1161–78.
 13. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(6):937–54.
 14. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart.* 2000;83(3):361–6.
 15. Suárez C, Cairols M, Castillo J, Esmatjes E, Sala J, Llobet X, et al. Control de factores de riesgo y tratamiento de la aterotrombosis. Registro REACH España. *Med Clin (Barc).* 2007;129(12):446–50.
 16. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circ J.* 2010;74(4):597–607.
 17. van Ommen CH, Peters M. The bleeding child. Part I: primary hemostatic disorders. *Eur J Pediatr.* 2012;171(1):1–10.

18. Guevara-Arismendy NM, Escobar-Gallo GE, Campuzano-Maya G. Utilidad clínica de la agregometría plaquetaria. *Medicina&Laboratorio*. 2012;18(7-8):311–32.
19. Lugo JJ, Hurtado EF, Calderón LI, Gómez G, Castro P, Estrada G, et al. Resistencia al ácido acetil salicílico y al clopidogrel: una entidad clínica. *Rev Col Cardiol*. 2008;15(4):172–83.
20. Arzamendi D, Freixa X, Puig M, Heras M. Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Rev Esp Cardiol*. 2006;6(Supl. H):2–10.
21. van Herrewegen F, Meijers JC, Peters M, van Ommen CH. The bleeding child. Part II: Disorders of secondary hemostasis and fibrinolysis. *Eur J Pediatr*. 2012;171(2):207–14.
22. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel. Clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(14):1505–16.
23. Moussa I, Oetgen M, Roubin G, Colombo A, Wang X, Iyer S, et al. Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. *Circulation*. 1999;99(18):2364–6.
24. Müller I, Seyfarth M, Rüdiger S, Wolf B, Pogatsa-Murray G, Schömig A, et al. Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart*. 2001;85(1):92–3.
25. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(11):1288–95.
26. Huber K. Genetic variability in response to clopidogrel therapy: clinical

- implications. *Eur Heart J*. 2010;31(24):2974–6.
27. Ficha técnica Plavix® (clopidogrel). Disponible en: www.aemps.gob.es/cima/.
 28. Thebault JJ, Kieffer G, Lowe GD, Nimmo WS, Cariou R. Repeated-dose pharmacodynamics of clopidogrel in healthy subjects. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25(Suppl 2):9–14.
 29. Boneu B, Destelle G. Platelet anti-aggregating activity and tolerance of clopidogrel in atherosclerotic patients. *Thromb Haemost*. 1996;76(6):939–43.
 30. Von Beckerath N, Kastrati A, Wiecek A, Pogatsa-Murray G, Sibbing D, Graf I, et al. A double-blind, randomized study on platelet aggregation in patients treated with a daily dose of 150 or 75 mg of clopidogrel for 30 days. *Eur Heart J*. 2007;28(15):1814–9.
 31. Cuisset T, Frere C, Quilici J, Morange PE, Nait-Saidi L, Carvajal J, et al. Benefit of a 600-mg loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(7):1339–45.
 32. Aradi D, Komócsi A, Price MJ, Cuisset T, Ari H, Hazarbasanov D, et al. Efficacy and safety of intensified antiplatelet therapy on the basis of platelet reactivity testing in patients after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2013;167(5):2140–8.
 33. Bonello L, Camoin-Jau L, Armero S, Com O, Arques S, Burignat-Bonello C, et al. Tailored clopidogrel loading dose according to platelet reactivity monitoring to prevent acute and subacute stent thrombosis. *Am J Cardiol*. 2009;103(1):5–10.
 34. Lotrionte M, Biondi-Zoccai GG, Agostoni P, Abbate A, Angiolillo DJ, Valgimigli

- M, et al. Meta-analysis appraising high clopidogrel loading in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2007;100(8):1199–206.
35. Gallego-Fabrega C, Krupinski J, Fernandez-Cadenas I. La resistencia en el tratamiento secundario del ictus isquémico, el componente genético en la respuesta a ácido acetilsalicílico y clopidogrel. *Neurologia.* 2015;30(9):566–73.
 36. Jin HY, Yang TH, Kim DI, Chung SR, Seo JS, Jang JS, et al. High post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay predicts long-term clinical outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction who underwent primary coronary stenting. *Int J Cardiol.* 2013;167(5):1877–81.
 37. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2005;366(9497):1607–21.
 38. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet.* 2001;358(9281):527–33.
 39. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. 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.
 40. Gent M, Beaumont D, Blanchard J, Bousser MG, Coffman J, Easton JD, et al. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet.* 1996;348(9038):1329–39.
 41. Mehta SR, Yusuf S, CURE Study Investigators. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme: rationale, design and baseline

- characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J*. 2000;21(24):2033–41.
42. Bhatt DL, Topol EJ, CHARISMA executive committee. Clopidogrel added to aspirin versus aspirin alone in secondary prevention and high-risk primary prevention: rationale and design of the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance (CHARISMA) trial. *Am Hear J*. 2004;148(2):263–8.
 43. Bhatt 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.
 44. del Castillo-Carnevali H, Barrios Alonso V, Zamorano Gómez JL. Antiagregación: resistencia a fármacos tradicionales y papel de los nuevos antiplaquetarios. *Med Clin (Barc)*. 2014;143(5):222–9.
 45. Ong AT, Hoye A, Aoki J, van Mieghem CA, Rodriguez Granillo GA, Sonnenschein K, et al. Thirty-day incidence and six-month clinical outcome of thrombotic stent occlusion after bare-metal, sirolimus, or paclitaxel stent implantation. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(6):947–53.
 46. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Paniccia R, et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(24):2312–7.
 47. Viviani Anselmi C, Briguori C, Roncarati R, Papa L, Visconti G, Focaccio A, et al. Routine assessment of on-clopidogrel platelet reactivity and gene polymorphisms in predicting clinical outcome following drug-eluting stent implantation in patients with stable coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Interv*. 2013;6(11):1166–75.

48. Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP, Fischer B, Valina CM, Ferenc M, et al. Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(9):1742–50.
49. Steg G, James SK, Atar D, Badano LP, Lundqvist CB, Borger MA, et al. Guía de práctica clínica de la ESC para el manejo del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66(1):53.e1-e46.
50. Chen SC, Hsiao FY, Lee CM, Hsu WW, Gau CS. Duration of dual antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention on re-hospitalization for acute coronary syndrome. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14(21):1–8.
51. Mauri L, Kereiakes DJ, Yeh RW, Driscoll-Shempp P, Cutlip DE, Steg PG, et al. Twelve or 30 months of dual antiplatelet therapy after drug-eluting stents. *N Engl J Med*. 2014;371(23):2155–66.
52. Park SJ, Park DW, Kim YH, Kang SJ, Lee SW, Lee CW, et al. Duration of dual antiplatelet therapy after implantation of drug-eluting stents. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1374–82.
53. Schulz-Schüpke S, Byrne RA, ten Berg JM, Neumann FJ, Han Y, Adriaenssens T, et al. ISAR-SAFE: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of 6 vs. 12 months of clopidogrel therapy after drug-eluting stenting. *Eur Heart J*. 2015;36(20):1252–63.
54. Colombo A, Chieffo A, Frasheri A, Garbo R, Masotti-Centol M, Salvatella N, et al. Second-Generation Drug-Eluting Stent Implantation Followed by 6- Versus 12-Month Dual Antiplatelet Therapy: The SECURITY Randomized Clinical Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(20):2086–97.

55. Gwon HC, Hahn JY, Park KW, Song YB, Chae IH, Lim DS, et al. Six-month versus 12-month dual antiplatelet therapy after implantation of drug-eluting stents: the efficacy of Xience/Promus versus Cypher to reduce late loss after stenting (EXCELLENT) randomized, multicenter study. *Circulation*. 2012;125(3):505–13.
56. Gilard M, Barragan P, Noryani AA, Noor HA, Majwal T, Hovasse T, et al. 6- versus 24-month dual antiplatelet therapy after implantation of drug-eluting stents in patients nonresistant to aspirin. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(8):777–86.
57. Valgimigli M, Campo G, Monti M, Vranckx P, Percoco G, Tumscitz C, et al. Short-versus long-term duration of dual-antiplatelet therapy after coronary stenting: a randomized multicenter trial. *Circulation*. 2012;125(16):2015–26.
58. Feres F, Costa RA, Bhatt DL, Leon MB, Botelho RV, King SB, et al. Optimized duration of clopidogrel therapy following treatment with the Endeavor zotarolimus-eluting stent in real-world clinical practice (OPTIMIZE) trial: rationale and design of a large-scale, randomized, multicenter study. *Am Heart J*. 2012;164(6):810–6.e3.
59. Feres F, Costa RA, Abizaid A, Leon MB, Marin-Neto JA, Botelho RV, et al. Three vs twelve months of dual antiplatelet therapy after zotarolimus-eluting stents: the OPTIMIZE randomized trial. *JAMA*. 2013;310(23):2510–22.
60. Kim BK, Hong MK, Shin DH, Nam CM, Kim JS, Ko YG, et al. A new strategy for discontinuation of dual antiplatelet therapy: the RESET trial (REal Safety and Efficacy of 3-month dual antiplatelet Therapy following Endeavor zotarolimus-eluting stent implantation). *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(15):1340–8.
61. Park JJ, Park KW, Kang J, Jeon KH, Kang SH, Ahn HS, et al. Genetic determinants of clopidogrel responsiveness in Koreans treated with drug-eluting stents. *Int J Cardiol*. 2013;163(1):79–86.

62. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009;360(4):354–62.
63. Ko YG, Suh JW, Kim BH, Lee CJ, Kim JS, Choi D, et al. Comparison of 2 point-of-care platelet function tests, VerifyNow Assay and Multiple Electrode Platelet Aggregometry, for predicting early clinical outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am Heart J.* 2011;161(2):383–90.
64. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda LE, Pahl A, Valina CM, et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(20):1925–34.
65. de Miguel Castro A, Cuellas Ramón C, Diego Nieto A, Samaniego Lampón B, Alonso Rodríguez D, Fernández Vázquez F, et al. La reactividad plaquetaria post-tratamiento predice los eventos adversos a largo plazo mejor que la respuesta al clopidogrel en pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(2):126–35.
66. Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thromb Res.* 2007;120(3):311–21.
67. Kang MK, Jeong YH, Yoon SE, Koh JS, Kim IS, Park Y, et al. Pre-procedural platelet reactivity after clopidogrel loading in Korean patients undergoing scheduled percutaneous coronary intervention. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(11):1122–31.
68. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, Kelder JC, Ruven HJ, Bal ET, et al. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *JAMA.* 2010;303(8):754–62.

69. Price MJ, Endemann S, Gollapudi RR, Valencia R, Stinis CT, Levisay JP, et al. Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *Eur Heart J*. 2008;29(8):992–1000.
70. Marcucci R, Gori AM, Paniccia R, Giusti B, Valente S, Giglioli C, et al. Cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting are predicted by residual platelet reactivity to ADP detected by a point-of-care assay: a 12-month follow-up. *Circulation*. 2009;119(2):237–42.
71. Mangiacapra F, Barbato E, Patti G, Gatto L, Vizzi V, Ricottini E, et al. Point-of-care assessment of platelet reactivity after clopidogrel to predict myonecrosis in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3(3):318–23.
72. Park DW, Ahn JM, Song HG, Lee JY, Kim WJ, Kang SJ, et al. Differential prognostic impact of high on-treatment platelet reactivity among patients with acute coronary syndromes versus stable coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention. *Am Heart J*. 2013;165(1):34–42.e1.
73. Fontana P, Senouf D, Mach F. Biological effect of increased maintenance dose of clopidogrel in cardiovascular outpatients and influence of the cytochrome P450 2C19*2 allele on clopidogrel responsiveness. *Thromb Res*. 2008;121(4):463–8.
74. Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schönig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost*. 2003;89(5):783–7.
75. Price MJ, Angiolillo DJ, Teirstein PS, Lillie E, Manoukian S V, Berger PB, et al. Platelet reactivity and cardiovascular outcomes after percutaneous coronary intervention: a time-dependent analysis of the Gauging Responsiveness with A

- VerifyNow P2Y12 assay: Impact on Thrombosis And Safety (GRAVITAS) trial. *Circulation*. 2011;124(10):1132–7.
76. Stone GW, Witzenbichler B, Weisz G, Rinaldi MJ, Neumann FJ, Metzger DC, et al. Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicentre registry study. *Lancet*. 2013;382(9892):614–23.
 77. Geisler T, Graß D, Bigalke B, Stellos K, Drosch T, Dietz K, et al. The residual platelet aggregation after deployment of intracoronary stent (PREDICT) score. *J Thromb Haemost*. 2008;6(1):54–61.
 78. Mangiacapra F, De Bruyne B, Muller O, Trana C, Ntalianis A, Bartunek J, et al. High residual platelet reactivity after clopidogrel. *JACC Cardiovasc Interv*. 2010;3(1):35–40.
 79. Siller-Matula JM, Trenk D, Schrör K, Gawaz M, Kristensen SD, Storey RF, et al. How to improve the concept of individualised antiplatelet therapy with P2Y12 receptor inhibitors - Is an algorithm the answer? *Thromb Haemost*. 2015;113(1):37–52.
 80. Tantry US, Bonello L, Aradi D, Price MJ, Jeong YH, Angiolillo DJ, et al. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(24):2261–73.
 81. Sibbing D, Schulz S, Braun S, Morath T, Stegherr J, Mehilli J, et al. Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):250–6.
 82. Campo G, Parrinello G, Ferraresi P, Lunghi B, Tebaldi M, Miccoli M, et al.

- Prospective evaluation of on-clopidogrel platelet reactivity over time in patients treated with percutaneous coronary intervention: Relationship with gene polymorphisms and clinical outcome. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(25):2474–83.
83. Patti G, Pasceri V, Vizzi V, Ricottini E, Di Sciascio G. Usefulness of platelet response to clopidogrel by point-of-care testing to predict bleeding outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention (from the antiplatelet therapy for reduction of myocardial damage during angioplasty-bleeding study). *Am J Cardiol.* 2011;107(7):995–1000.
 84. Shuldiner AR, O’Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA.* 2009;302(8):849–57.
 85. Angiolillo DJ, Alfonso F. Platelet function testing and cardiovascular outcomes: steps forward in identifying the best predictive measure. *Thromb Haemost.* 2007;98(4):707–9.
 86. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, et al. Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes.* 2005;54(8):2430–5.
 87. Burkard T, Kaiser CA, Brunner-La Rocca H, Osswald S, Pfisterer ME, Jeger RV. Combined clopidogrel and proton pump inhibitor therapy is associated with higher cardiovascular event rates after percutaneous coronary intervention: A report from the BASKET trial. *J Intern Med.* 2012;271(3):257–63.
 88. Price MJ, Nayak KR, Barker CM, Kandzari DE, Teirstein PS. Predictors of heightened platelet reactivity despite dual-antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2009;103(10):1339–43.

89. Qureshi Z, Hobson AR. Clopidogrel “resistance”: where are we now? *Cardiovasc Ther.* 2013;31(1):3–11.
90. Geisler T, Schaeffeler E, Dippon J, Winter S, Buse V, Bischofs C, et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics.* 2008;9(9):1251–9.
91. Angiolillo DJ, Ferreiro JL. Inhibición del receptor plaquetario P2Y₁₂ de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63(1):60–76.
92. Roy P, Bonello L, Torguson R, Okabe T, Pinto Slottow TL, Steinberg DH, et al. Temporal relation between clopidogrel cessation and stent thrombosis after drug-eluting stent implantation. *Am J Cardiol.* 2009;103(6):801–5.
93. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J.* 2007;154(2):221–31.
94. Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, Abrecht L, Vaina S, Morger C, et al. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. *Lancet.* 2007;369(9562):667–78.
95. Angiolillo DJ, Bernardo E, Ramírez C, Costa MA, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, et al. Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(2):298–304.
96. Sibbing D, von Beckerath O, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N. Impact of

- body mass index on platelet aggregation after administration of a high loading dose of 600 mg of clopidogrel before percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2007;100(2):203–5.
97. Feher G, Koltai K, Alkonyi B, Papp E, Keszthelyi Z, Kesmarky G, et al. Clopidogrel resistance: role of body mass and concomitant medications. *Int J Cardiol.* 2007;120(2):188–92.
 98. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Barrera Ramírez C, Sabaté M, Fernández C, et al. Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J Invasive Cardiol.* 2004;16(4):169–74.
 99. Bates ER, Lau WC, Angiolillo DJ. Clopidogrel-drug interactions. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(11):1251–63.
 100. Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS et al. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation.* 2003;107(1):32–7.
 101. Gilard M, Arnaud B, Le Gal G, Abgrall JF, Boschhat J. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost.* 2006;4(11):2508–9.
 102. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG, et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation.* 2004;109(2):166–71.
 103. Farid NA, Payne CD, Small DS, Winters KJ, Ernest CS, Brandt JT, et al. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther.*

2007;81(5):735–41.

104. Suh JW, Koo BK, Zhang SY, Park KW, Cho JY, Jang IJ, et al. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *CMAJ*. 2006;174(12):1715–22.
105. Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G, et al. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(3):256–60.
106. Bhatt DL, Cryer BL, Contant CF, Cohen M, Lanos A, Schnitzer TJ, et al. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2010;363(20):1909–17.
107. Siller-Matula JM, Delle-Karth G. Addition of omeprazole to dual antiplatelet therapy with clopidogrel plus aspirin lowers the risk of upper gastrointestinal bleeding. *Evid Based Med*. 2011;16(5):144–5.
108. Nota informativa de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios: Posible interacción de clopidogrel con los inhibidores de la bomba de protones. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2009/NI_2009-07_clopidogrel.htm.
109. Nota informativa de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios: Interacción de clopidogrel con los inhibidores de la bomba de protones: actualización de la información y recomendaciones de uso. Disponible: https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2010/NI_2010-04_clopidogrel.htm
110. Sánchez Ruiz-Gordoa M, Tenías Burillo JM, Ruiz Martín De La Torre R,

- Valenzuela Gámez JC. Impacto de las alertas farmacoterapéuticas sobre la prescripción de clopidogrel e inhibidores de la bomba de protones en pacientes ingresados. *Farm Hosp.* 2012;36(4):250–5.
111. Park JJ, Park KW, Kang J, Jeon KH, Kang SH, Ahn HS, et al. CYP3A4 genetic status may be associated with increased vulnerability to the inhibitory effect of calcium-channel blockers on clopidogrel. *Circ J.* 2013;77(5):1289–96.
 112. Siller-Matula JM, Lang I, Christ G, Gilma B. Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(19):1557–63.
 113. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Calcium-channel blockers decrease clopidogrel-mediated platelet inhibition. *Heart.* 2010;96(3):186–9.
 114. Bliden KP, DiChiara J, Lawal L, Singla A, Antonino MJ, Baker BA, et al. The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(7):531–3.
 115. Gurbel PA, Bliden KP, Logan DK, Kereiakes DJ, Lasseter KC, White A, et al. The influence of smoking status on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel and prasugrel: the PARADOX study. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(6):505–12.
 116. Desai NR, Mega JL, Jiang S, Cannon CP, Sabatine MS. Interaction between cigarette smoking and clinical benefit of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(15):1273–8.
 117. Lau WC, Welch TD, Shields T, Rubenfire M, Tantry US, Gurbel PA. The effect of St John's Wort on the pharmacodynamic response of clopidogrel in hyporesponsive volunteers and patients: increased platelet inhibition by enhancement of CYP3A4

- metabolic activity. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(1):86–93.
118. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Panicia R, Romano E, Gensini GF, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost*. 2008;99(5):930–5.
 119. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, Arikan M, Tellez A, DeLao T, et al. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(9):743–9.
 120. Daudén Tello E. Farmacogenética I. Concepto, historia, objetivos y áreas de estudio. *Actas Dermosifiliogr*. 2006;97(10):623–9.
 121. Lubomirov R, Telenti A, Rotger M. Conceptos generales y métodos de estudio en farmacogenética. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(Suppl. 6):4–9.
 122. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in clinical individuality. 1902. *Mol Med*. 1996;2(3):274-82.
 123. López-López M, Guerrero-Camacho JL, Familiar-López IM, Jung-Cook H, Corona-Vázquez T, Alonso-Vilatela ME. Farmacogenómica: búsqueda de la terapia personalizada. *Rev Neurol*. 2004;39(11):1063–71.
 124. Gurwitz D, Motulsky AG. “Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics”: 50 years later. *Pharmacogenomics*. 2007;8(11):1479–84.
 125. Ortega-Mata M. Farmacogenética, farmacogenómica y proteómica en la medicina personalizada. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2004. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/534/552>

126. Meyer UA. Pharmacogenetics - Five Decades of Therapeutic Lessons From Genetic Diversity. *Nat Rev Genet.* 2004;5(9):669–76.
127. Kalow W. *Pharmacogenetics: heredity and the response to drugs.* W.B. Saunders & Co., Philadelphia, USA. 1962.
128. Ameen M, Smith CH, Barker JN. Pharmacogenetics in clinical dermatology. *Br J Dermatol.* 2002;146(1):2–6.
129. Brockmöller J, Tzvetkov MV. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008;64(2):133–57.
130. Torrades S. Farmacogenética: la medicina a la carta. *Offarm.* 2002;21(10):126–30.
131. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: A review of the evidence. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(8):1157–64.
132. Oprea AD, Popescu WM. P2Y₁₂ receptor inhibitors in acute coronary syndromes: what is new on the horizon? *Cardiol Res Pract.* 2013;2013:195456.
133. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(1):92–9.
134. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gómez A, Rodríguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007;116(3):496–526.

135. Kirchheiner J, Schmidt H, Tzvetkov M, Keulen J-T, Lötsch J, Roots I, et al. Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to CYP2D6 duplication. *Pharmacogenomics J.* 2007;7(4):257–65.
136. Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450–metabolized drugs. *Am J Med.* 2002;113(9):746–50.
137. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. Disponible en: <http://www.cypalleles.ki.se/>.
138. Harmsze A, van Werkum JW, Bouman HJ, Ruven HJ, Breet NJ, Ten Berg JM, et al. Besides CYP2C19*2, the variant allele CYP2C9*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(1):18–25.
139. The ensembl project. Disponible en <http://www.ensembl.org>.
140. Miura G, Ariyoshi N, Sato Y, Yamaguchi H, Iwata Y, Fujimoto Y, et al. Genetic and non-genetic factors responsible for antiplatelet effects of clopidogrel in Japanese patients undergoing coronary stent implantation: an algorithm to predict on-clopidogrel platelet reactivity. *Thromb Res.* 2014;134(4):877–83.
141. Bergmeijer TO, ten Berg JM. Valor de la determinación del genotipo de CYP2C19 *2 y *17 en la práctica clínica. Prometedor, aunque todavía no está listo. *Rev Esp Cardiol.* 2012;65(3):205–7.
142. Liang ZY, Han YL, Zhang XL, Li Y, Yan CH, Kang J. The impact of gene polymorphism and high on-treatment platelet reactivity on clinical follow-up: outcomes in patients with acute coronary syndrome after drug-eluting stent implantation. *EuroIntervention.* 2013;9(3):316–27.

143. Pettersen AA, Arnesen H, Opstad TB, Seljeflot I. The influence of CYP 2C19*2 polymorphism on platelet function testing during single antiplatelet treatment with clopidogrel. *Thromb J*. 2011;9(1):4.
144. Tello-Montoliu A, Jover E, Marín F, Bernal A, Lozano ML, Sánchez-Vega B, et al. Influencia de los polimorfismos de CYP2C19 en la reactividad plaquetaria y el pronóstico en una población no seleccionada de pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65(3):219–26.
145. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccchia R, et al. Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. *Am J Cardiol*. 2009;103(6):806–11.
146. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(3):317–23.
147. Lee JM, Park S, Shin DJ, Choi D, Shim CY, Ko YG, et al. Relation of genetic polymorphisms in the cytochrome P450 gene with clopidogrel resistance after drug-eluting stent implantation in Koreans. *Am J Cardiol*. 2009;104(1):46–51.
148. Kreutz RP, Nystrom P, Kreutz Y, Miao J, Desta Z, Breall JA, et al. Influence of paraoxonase-1 Q192R and cytochrome P450 2C19 polymorphisms on clopidogrel response. *Clin Pharmacol*. 2012;4:13–20.
149. Harmsze AM, Van Werkum JW, Ten Berg JM, Zwart B, Bouman HJ, Breet NJ, et al. CYP2C19*2 and CYP2C9*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study. *Eur Heart J*. 2010;31(24):3046–53.
150. Park KJ, Chung HS, Kim SR, Kim HJ, Han JY, Lee SY. Clinical, pharmacokinetic, and pharmacogenetic determinants of clopidogrel resistance in Korean patients with

- acute coronary syndrome. *Korean J Lab Med.* 2011;31(2):91–4.
151. Mega JL, Simon T, Collet JP, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA.* 2010;304(16):1821–30.
 152. Tiroch KA, Sibbing D, Koch W, Roosen-Runge T, Mehilli J, Schömig A, et al. Protective effect of the CYP2C19*17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am Heart J.* 2010;160(3):506–12.
 153. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation.* 2010;121(4):512–8.
 154. Siller-Matula JM, Delle-Karth G, Lang IM, Neunteufl T, Kozinski M, Kubica J, et al. Phenotyping vs. genotyping for prediction of clopidogrel efficacy and safety: the PEGASUS-PCI study. *J Thromb Haemost.* 2012;10(4):529–42.
 155. Rath PC, Chidambaram S, Rath P, Dikshit B, Naik S, Sahoo PK, et al. A study on the impact of CYP2C19 genotype and platelet reactivity assay on patients undergoing PCI. *Indian Heart J.* 2015;67(2):114–21.
 156. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RH. CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics.* 2013;14(1):47–62.
 157. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Cavallari U, Trabetti E, et al. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel. *Arterioscler*

Thromb Vasc Biol. 2006;26(8):1895–900.

158. Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(1):82–91.
159. Gladding P, Webster M, Zeng I, Farrell H, Stewart J, Ruygrok P, et al. The pharmacogenetics and pharmacodynamics of clopidogrel response: an analysis from the PRINC (Plavix Response in Coronary Intervention) trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2008;1(6):620–7.
160. Frere C, Cuisset T, Morange PE, Quilici J, Camoin-Jau L, Saut N, et al. Effect of cytochrome P450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 2008;101(8):1088–93.
161. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS, et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost.* 2007;5(12):2429–36.
162. Gori AM, Cesari F, Marcucci R, Giusti B, Paniccia R, Antonucci E, et al. The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with platelet aggregability in acute coronary syndrome patients. *Atherosclerosis.* 2009;202(1):255–62.
163. Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med.* 2011;17(1):110–6.
164. Campo G, Ferraresi P, Marchesini J, Bernardi F, Valgimigli M. Relationship

- between paraoxonase Q192R gene polymorphism and on-clopidogrel platelet reactivity over time in patients treated with percutaneous coronary intervention. *J Thromb Haemost.* 2011;9(10):2106–8.
165. Park KW, Park JJ, Kang J, Jeon KH, Kang SH, Han JK, et al. Paraoxonase 1 gene polymorphism does not affect clopidogrel response variability but is associated with clinical outcome after PCI. *PLoS One.* 2013;8(2):e52779.
166. Paré G, Ross S, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, et al. Effect of PON1 Q192R genetic polymorphism on clopidogrel efficacy and cardiovascular events in the clopidogrel in the unstable angina to prevent recurrent events trial and the atrial fibrillation clopidogrel trial with irbesartan for prevention of vascular events. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(2):250–6.
167. Reny JL, Combescure C, Daali Y, Fontana P. Influence of the paraoxonase-1 Q192R genetic variant on clopidogrel responsiveness and recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2012;10(7):1242–51.
168. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Zolk O, Valina CM, Stratz C, et al. Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011;4(4):429–36.
169. The Pharmacogenomics Knowledgebase. Disponible en: <http://www.pharmgkb.org>.
170. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drout E, Méneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009;360(4):363–75.
171. Lewis JP, Horenstein RB, Ryan K, O’Connell JR, Gibson Q, Mitchell BD, et al. The

- functional G143E variant of carboxylesterase 1 is associated with increased clopidogrel active metabolite levels and greater clopidogrel response. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(1):1–8.
172. Bura A, Bachelot-Loza C, Ali FD, Aiach M, Gaussem P. Role of the P2Y12 gene polymorphism in platelet responsiveness to clopidogrel in healthy subjects. *J Thromb Haemost*. 2006;4(9):2096–7.
173. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccia R, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(12):1057–64.
174. Cayla G, Hulot JS, O'Connor SA, Pathak A, Scott SA, Gruel Y, et al. Clinical, angiographic, and genetic factors associated with early coronary stent thrombosis. *JAMA*. 2011;306(16):1765–74.
175. Malinin A, Pokov A, Spergling M, Defranco A, Schwartz K, Schwartz D, et al. Monitoring platelet inhibition after clopidogrel with the VerifyNow-P2Y12 rapid analyzer: the VERify Thrombosis risk ASsessment (VERITAS) study. *Thromb Res*. 2007;119(3):277–84.
176. Instrucciones de uso. VerifyNow P2Y12. Análisis de la reactividad plaquetaria. Accumetrics. 2013.
177. Brar SS, ten Berg J, Marcucci R, Price MJ, Valgimigli M, Kim HS, et al. Impact of platelet reactivity on clinical outcomes after percutaneous coronary intervention: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(19):1945–54.

178. Cuisset T, Hamilos M, Sarma J, Sarno G, Wyffels E, Vanderheyden M, et al. Relation of low response to clopidogrel assessed with point-of-care assay to periprocedural myonecrosis in patients undergoing elective coronary stenting for stable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2008;101(12):1700–3.
179. von Beckerath N, Pogatsa-Murray G, Wiczorek A, Sibbing D, Schömig A, Kastrati A. Correlation of a new point-of-care test with conventional optical aggregometry for the assessment of clopidogrel responsiveness. *Thromb Haemost.* 2006;95(5):910–1.
180. van Werkum JW, van der Stelt CA, Seesing TH, Hackeng CM, ten Berg JM. A head-to-head comparison between the VerifyNow P2Y12 assay and light transmittance aggregometry for monitoring the individual platelet response to clopidogrel in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *J Thromb Haemost.* 2006;4(11):2516–8.
181. Gurbel PA, Erlinge D, Ohman EM, Neely B, Neely M, Goodman SG, et al. Platelet function during extended prasugrel and clopidogrel therapy for patients with ACS treated without revascularization: the TRILOGY ACS platelet function substudy. *JAMA.* 2012;308(17):1785–94.
182. Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. QIAGEN. 2012.
183. Jayasinghe R, Markham R, Adsett G. Dual antiplatelet therapy. Management in general practice. *Aust Fam Physician.* 2013;42(10):702–5.
184. Fontana P, Hulot JS, de Moerloose P, Gaussem P. Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost.* 2007;5(10):2153–5.
185. Stimpfle F, Karathanos A, Droppa M, Metzger J, Rath D, Müller K, et al. Impact of

- point-of-care testing for CYP2C19 on platelet inhibition in patients with acute coronary syndrome and early dual antiplatelet therapy in the emergency setting. *Thromb Res.* 2014;134(1):105–10.
186. Nakkam N, Tiamkao S, Kanjanawart S, Tiamkao S, Vannaprasaht S, Tassaneeyakul W, et al. The impact of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes on the pharmacodynamics of clopidogrel under steady state conditions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2015;30(4):295–304.
187. Sibbing D, Gebhard D, Koch W, Braun S, Stegherr J, Morath T, et al. Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy. *J Thromb Haemost.* 2010;8(8):1685–93.
188. Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1704–14.
189. Bouman HJ, Harmsze AM, van Werkum JW, Breet NJ, Bergmeijer TO, Ten Cate H, et al. Variability in on-treatment platelet reactivity explained by CYP2C19*2 genotype is modest in clopidogrel pretreated patients undergoing coronary stenting. *Heart.* 2011;97(15):1239–44.
190. Sibbing D, Koch W, Massberg S, Byrne RA, Mehilli J, Schulz S, et al. No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J.* 2011;32(13):1605–13.
191. Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, et al. Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. *Heart.* 2012;98(2):100–8.

192. Toma C, Zahr F, Moguilanski D, Grate S, Semaan RW, Lemieux N, et al. Impact of anemia on platelet response to clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary stenting. *Am J Cardiol.* 2012;109(8):1148–53.
193. Maeda A, Ando H, Asai T, Ishiguro H, Umemoto N, Ohta M, et al. Differential impacts of CYP2C19 gene polymorphisms on the antiplatelet effects of clopidogrel and ticlopidine. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(2):229–33.
194. Rangé G, Yayehd K, Belle L, Thuairé C, Richard P, Cazaux P, et al. Thrombotic and bleeding events after coronary stenting according to clopidogrel and aspirin platelet reactivity: VerifyNow French Registry (VERIFRENCHY). *Arch Cardiovasc Dis.* 2014;107(4):225–35.
195. Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED, et al. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA.* 2009;301(9):937–44.
196. Kwan J, Htun WW, Huang Y, Ko W, Kwan TW. Effect of proton pump inhibitors on platelet inhibition activity of clopidogrel in Chinese patients with percutaneous coronary intervention. *Vasc Health Risk Manag.* 2011;7(1):399–404.
197. Cappelletti Galante M, Garcia Santos V, Bezerra Da Cunha GW. Valoración del uso de clopidogrel asociado a medicamentos gastroprotectores en pacientes ambulatorios. *Farm Hosp.* 2012;36(4):216–9.
198. Amariles P, Holguín H, Angulo NY, Betancourth PM, Ceballos M. Efecto de la interacción clopidogrel-omeprazol en el reingreso hospitalario de pacientes por recidiva de síndrome coronario agudo: estudio de casos y controles. *Aten Primaria.* 2014;46(8):426–32.
199. Braga da Silva F, Gouvêa De Almeida Junior GL, Neno A, Kezen J, Spelta M,

- Godomiczer A, et al. Resistance to clopidogrel: prevalence and associate variables. *Arq Bras Cardiol.* 2012;99(6):1135–41.
200. O’Donoghue ML, Braunwald E, Antman EM, Murphy SA, Bates ER, Rozenman Y, et al. Pharmacodynamic effect and clinical efficacy of clopidogrel and prasugrel with or without a proton-pump inhibitor: an analysis of two randomised trials. *Lancet.* 2009;374(9694):989–97.
201. Tousek P, Kocka V, Sulzenko J, Bednar F, Linkova H, Widimsky P. Pharmacodynamic effect of clopidogrel in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Biomed Res Int.* 2013;2013:10–2.
202. Aradi D, Storey RF, Komocsi A, Trenk D, Gulba D, Kiss RG, et al. Expert position paper on the role of platelet function testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2014;35(4):209–15.
203. Pelliccia F, Rosano G, Marazzi G, Vitale C, Spoletini I, Franzoni F, et al. Pharmacodynamic comparison of pitavastatin versus atorvastatin on platelet reactivity in patients with coronary artery disease treated with dual antiplatelet therapy. *Circ J.* 2014;78(3):679–84.
204. Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, Gorchakova O, Lazar A, von Beckerath N, et al. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost.* 2004;92(2):311–6.
205. Savcic M, Hauert J, Bachmann F, Wyld PJ, Geudelin B, Cariou R. Clopidogrel loading dose regimens: kinetic profile of pharmacodynamic response in healthy subjects. *Semin Thromb Hemost.* 1999;25(Suppl 2):15–9.
206. Lee JA, Lee CR, Reed BN, Plitt DC, Polasek MJ, Howell LA, et al. Implementation and evaluation of a CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy algorithm in

- high-risk coronary artery disease patients. *Pharmacogenomics*. 2015;16(4):303–13.
207. Ari H, Ozkan H, Karacinar A, Ari S, Koca V, Bozat T. The Effect of high-dose Clopidogrel treatment in patients with clopidogrel resistance (The EFFICIENT Trial). *Int J Cardiol*. 2012;157(3):374–80.
208. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, Tanguay JF, Angiolillo DJ, Spriggs D, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA*. 2011;305(11):1097–105.
209. Varenhorst C, James S, Erlinge D, Braun OO, Brandt JT, Winters KJ, et al. Assessment of P2Y12 inhibition with the point-of-care device VerifyNow P2Y12 in patients treated with prasugrel or clopidogrel coadministered with aspirin. *Am Heart J*. 2009;157(3):562.e1–9.
210. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2001–15.
211. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1045–57.
212. Patel V, Lin FJ, Ojo O, Rao S, Yu S, Zhan L, et al. Cost-utility analysis of genotype-guided antiplatelet therapy in patients with moderate-to-high risk acute coronary syndrome and planned percutaneous coronary intervention. *Pharm Pract*. 2014;12(3):438.

