



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ**

**PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS DEL CITOCROMO CYP2C19 EN  
PACIENTES CON ATEROSCLEROSIS CORONARIA O CEREBRAL.  
RELACIÓN DEL POLIMORFISMO CYP2C19 CON LA ACTIVIDAD  
PLAQUETARIA RESIDUAL EN EL TRATAMIENTO CON  
CLOPIDOGREL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN CARDIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

***Dr. Pablo Francisco Acevedo Gómez***

***México, Distrito Federal***

***Agosto 2013***



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Medicina**

**División Estudios de Posgrado**



**Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

**Título**

**Prevalencia de polimorfismos del citocromo CYP2C19 en pacientes con aterosclerosis coronaria o cerebral. Relación del polimorfismo CYP2C19 con la actividad plaquetaria residual en el tratamiento con clopidogrel**

***Tesista:***

Dr. Pablo Francisco Acevedo Gómez

Residente de la especialidad en cardiología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

***Tutor de Tesis:***

Dr. Raúl Izaguirre Ávila

Jefe del Departamento de Hematología, del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

***Co- Asesor de Tesis:***

QFB. Evelyn Cortina de la Rosa

Laboratorio de Trombosis, Fibrinólisis y Función Plaquetaria



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ**



## **TESIS**

**Prevalencia de polimorfismos del citocromo CYP2C19 en pacientes con aterosclerosis coronaria o cerebral. Relación del polimorfismo CYP2C19 con la actividad plaquetaria residual en el tratamiento con clopidogrel**

**Director de Enseñanza del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez**

---

**Dr. José Fernando Guadalajara Boo**

**Tutor de tesis**

---

**Dr. Raúl Izaguirre Ávila**

**Co-Asesor de tesis**

---

**QFB. Evelyn Cortina de la Rosa**

**Tesista**

---

**Dr. Pablo Francisco Acevedo Gómez**

## **Agradecimientos:**

**A mi Madre: mujer incansable, mi orgullo, ejemplo constante de lucha y dedicación, mi primer y única héroe. Gracias porque sin tu ejemplo, tus cuidados y tu impulso nunca hubiera logrado a ser el hombre que soy. Espero algún día ser un padre como tú lo fuiste conmigo mamá, Te quiero mucho**

**A mi Abuelita: Gracias por todas tus bendiciones para cada examen, para cada aventura de mi vida, gracias por tus consejos de vida. Hasta donde este te mando un beso y un abrazo abuelita.**

**A mi tía Elena, mi tío Chuy, mi tía Pera: gracias por ser un ejemplo y ser mis padres en este caminar, siempre están en mis pensamientos y en mis anhelos.**

**A mis primos Eréndira, Chuy y Alejandro mis hermanos, mis amigos y mis compañeros de batallas, los quiero muchísimo.**

**A mi esposa Kity: tendría que escribir un libro para poder agradecerte todo lo que hace día a día por mí, no existe palabra adecuada para expresar, lo que siento, solo cabría decirte, gracias. Gracias amor por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por acompañarme en esta aventura de mi vida profesional por forzarme a estudiar, a terminar trabajos, por levantarme de la televisión o la cama y ponerte a mi lado a estudiar. Gracias por ser mi consejera, mi amiga, mi compañera de estudio. Todo lo que hoy en día hago es para que nuestro futuro sea mejor, y sé que a pesar de que nos costó trabajo entenderlo así, somos un equipo, somos dos aventureros en la mar, en este viaje que se llama vida. Gracias esposa mía te amo.**

## **Agradecimientos**

**Al Dr. Raúl Izaguirre: Pocos maestros de vida me ha puesto Dios en el camino, y usted es uno de ellos, agradezco su apoyo su confianza, sus enseñanzas, ha llegado a ser más que un maestro y un asesor, un Amigo. Gracias**

**A Evelyn: Gracias por la paciencia, sé que la desesperación te acompañó conmigo, pero las enseñanzas recibidas para mí son invaluable. Gracias por tu apoyo y sugerencias.**

**A los pacientes: mis maestros del día a día, nunca podre devolver las enseñanzas obtenidos de ellos, solo me queda el hacer bien las cosas, prepararme todos los días hasta como lo digo el maestro Chávez sea yo un trabajador inútil. Con ustedes es el compromiso de vida de siempre hacer lo correcto. Gracias por permitirme aprender más.**

---

## INDICE

|  |                  |
|--|------------------|
| <b>MARCO TEORICO.....</b>  | <b>9</b>         |
| <b>INTRODUCCION.....</b>   | <b>9</b>         |
| <b>LA PLAQUETA .....</b>   | <b>10</b>        |
| Activación plaquetaria .....   | 11               |
| Tromboxano A2 (TxA2), amplificador de la activación plaquetaria .....      | 14               |
| Implicación de la glucoproteína IIb/IIIa en la activación de las plaquetas | 16               |
| Receptores de la trombina .....  | 16               |
| Mecanismos endógenos de inhibición de las plaquetas .....                  | 17               |
| Hiperactividad plaquetaria y marcadores plaquetarios de actividad .....    | 18               |
| <b>ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS .....</b>           | <b>20</b>        |
| <b>INHIBIDORES DE LA CICLOOXIGENASA. ÁCIDO ACETILSALICÍLICO .....</b>      | <b>22</b>        |
| <b>ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL ADP. CLOPIDOGREL .....</b>                | <b>24</b>        |
| Metabolismo del clopidogrel.....   | 26               |
| Variabilidad de la respuesta al clopidogrel .....                          | 28               |
| Pruebas genéticas.....   | 28               |
| Trascendencia clínica.....   | 29               |
| Riesgo hemorrágico.....  | 31               |
| <b>ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO ALTERNATIVAS.....</b>                        | <b>32</b>        |
| <b>MEDICINA ANTIAGREGANTE PLAQUETARIA INDIVIDUALIZADA .....</b>            | <b>32</b>        |
| <b><u>DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....</u></b>                                | <b><u>33</u></b> |
| <b><u>JUSTIFICACIÓN .....</u></b>  | <b><u>34</u></b> |
| <b><u>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</u></b>                              | <b><u>35</u></b> |
| <b><u>HIPOTESIS .....</u></b>  | <b><u>36</u></b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>OBJETIVOS</u></b> .....  | <b>37</b> |
| OBJETIVO GENERAL .....   | 37        |
| OBJETIVOS SECUNDARIO.....  | 37        |
| <b><u>MATERIAL Y METODOS</u></b> .....   | <b>38</b> |
| DISEÑO DEL ESTUDIO .....   | 38        |
| DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO .....   | 38        |
| Población Objetivo .....   | 38        |
| Población Elegible.....  | 38        |
| Criterios de inclusión .....   | 39        |
| Criterios de exclusión .....   | 39        |
| <b><u>METODOLOGIA</u></b> .....  | <b>40</b> |
| DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS .....   | 40        |
| PRUEBAS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA .....  | 41        |
| <b><u>ANALISIS ESTADÍSTICO</u></b> .....   | <b>42</b> |
| <b><u>RESULTADOS</u></b> .....   | <b>43</b> |
| CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA .....  | 43        |
| PREVALENCIA DE LOS POLIMORFISMOS CYP2C19 .....   | 45        |
| GRUPOS DE RESPUESTA Y RESISTENCIA AL TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO.....  | 46        |
| DIFERENCIAS EN LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA MÁXIMA DE ACUERDO AL POLIMORFISMO .....                             | 48        |
| ANÁLISIS POR GRUPOS DE POLIMORFISMOS FAVORABLES O DESFAVORABLES PARA EL<br>METABOLISMO DEL CLOPIDOGREL ..... | 49        |
| <b><u>DISCUSION</u></b> .....  | <b>50</b> |
| <b><u>LIMITACIONES</u></b> .....   | <b>55</b> |



**RETOS .....55**

**CONCLUSIONES .....56**

**BIBLIOGRAFIA .....57**



# MARCO TEORICO

---

## INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica hoy en día se considera el azote de la humanidad, como lo fueron durante la edad media, las enfermedades infecto contagiosas, que traían mortalidad temprana y disminución de la esperanza de vida poblacional. Se vive una realidad muy diferente ya que los cambios en los sistemas de salud han modificado la epidemiología actual, gracias a la accesibilidad a los mismos y sobre todo, el estilo de vida, entre los que destacan, el sedentarismo, el acceso a alimentos con déficit nutricional, tabaquismo y el aumento de estrés laboral y social,.

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte, de acuerdo a lo comunicado en algunos registros mundiales y en especial en nuestro país, donde el incremento de la obesidad, la diabetes mellitus y el sedentarismo, han traído consigo la innovación en el manejo de esta enfermedad en los últimos años. De ahí que el conocimiento de la fisiopatología y tratamiento actual de la enfermedad sea de suma importancia en la formación médica y social.

En este trabajo pretendemos recordar aspectos importantes de la fisiología de la trombosis así como la participación crucial de las plaquetas y como hoy en día la terapia anti plaquetaria se encuentra como un pilar en el manejo de la enfermedad, conocer las alteraciones genéticas, y la correlación entre las diferentes estrategias para poder medir el efecto del tratamiento y así poder incidir en el manejo de la misma

## LA PLAQUETA

La hemostasia es uno de los procesos de defensa del organismo y tiene como función evitar la hemorragia; sin embargo su activación en condiciones inapropiadas y de manera desorganizada, como en el sistema venoso o arterial puede convertirse en un proceso patológico.

De los elementos que forman la sangre, la plaqueta fue el último en ser descubierto. Se considera al francés Alfred Donne (1801–1878) como el descubridor de las plaquetas, aunque también se atribuye al médico inglés George Gulliver (1804–1882). No fue hasta finales del siglo XIX cuando Giulio Bizzozero (1841–1901) aisló las plaquetas de los trombos e identificó la hemostasia y la trombosis como procesos análogos<sup>1</sup>

Las plaquetas son células enucleadas de 1 – 2  $\mu\text{m}$  de tamaño, generadas en la médula ósea por fragmentación de los bordes de los megacariocitos. La cantidad fisiológica de plaquetas es de 150–400  $\times 10^9/\text{L}$ . Un adulto sano produce cada día una media de  $1 \times 10^{11}$  plaquetas. La expectativa de vida de las plaquetas es de 7 a 10 días<sup>1</sup>.

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma inactiva y expresan en su superficie un número relativamente pequeño de moléculas que, en estado activado, van a facilitar su interacción con otras plaquetas y otras células de su entorno. Además, las plaquetas contienen diferentes tipos de gránulos (fundamentalmente gránulos densos, gránulos  $\alpha$  y lisosomas) desde los que, al ser activadas, liberan diferentes factores almacenados en ellos, que a su vez estimulan más la actividad de la propia plaqueta. Estos factores tienen también efectos biológicos sobre otras células del entorno plaquetario. Un estudio proteómico ha descrito que las plaquetas activadas por trombina liberan más de 300 proteínas diferentes, muchas de ellas relacionadas con reacciones inflamatorias<sup>2</sup>. La liberación de los gránulos densos en las plaquetas ocurre por exocitosis, y desde ellos se liberan difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), fosfato inorgánico, polifosfatos, serotonina y calcio, entre otros.<sup>2</sup>

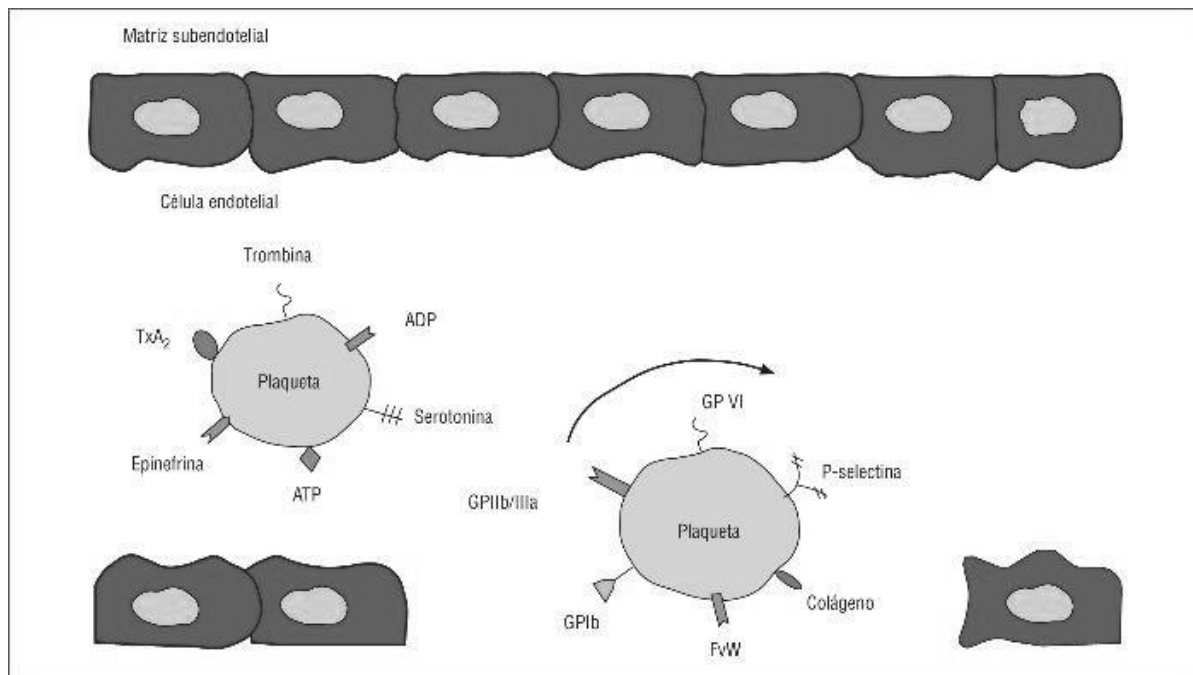
La liberación de ADP es esencial como cofactor de la agregación plaquetaria y actúa mediante su interacción con receptores específicos localizados en la superficie plaquetaria. Se conocen dos receptores para el ADP en la plaqueta, uno acoplado a la proteína Gq (el P2Y<sub>1</sub>) y otro acoplado a Gi (el P2Y<sub>12</sub>), que es esencial para la hemostasia primaria<sup>3,4</sup>. Ambos receptores actúan de modo sinérgico en la activación de las plaquetas. El P2Y<sub>1</sub> probablemente sea el que origina la activación inicial reversible, mientras que el P2Y<sub>12</sub> es necesario para la activación prolongada y la agregación plaquetaria. El ADP y el ATP no sólo pueden actuar como coactivadores plaquetarios, sino también influir en el tono vascular.

### *Activación Plaquetaria*

El mecanismo de formación del trombo plaquetario puede dividirse en cuatro etapas:

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

En cada fase actúa una serie de mecanismos no completamente conocidos. La GPIIb $\alpha$  actúa en la fase inicial de frenado de las plaquetas sobre la pared vascular. La GPIIb $\alpha$  se expresa de forma constitutiva en la superficie de la plaqueta e inicia el proceso de adhesión plaquetaria uniéndose al colágeno y al factor von Willebrand (FvW)<sup>5</sup>. El FvW estará embebido en las fibras de colágeno, particularmente del colágeno de tipos I, III y VI. En los vasos con alto estrés como las arterias, el FvW es esencial para reducir el flujo rápido de las plaquetas mediante la interacción del dominio A1 del FvW con GPIIb $\alpha$ . Sin embargo, la GPIIb $\alpha$  es también el receptor más conocido de la proteína Mac-1, localizada en la superficie de los leucocitos activados. Mediante la interacción entre GPIIb $\alpha$  y Mac-1 ocurre la unión entre plaqueta y leucocito, importante en la respuesta inflamatoria mediada por las plaquetas. (Figura 1)



**Figura 1.** Principales agonistas y proteínas de adhesión que en la plaqueta participan en el proceso de activación plaquetaria. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; FvW: factor de von Willebrand; GP: glucoproteína; TxA2: tromboxano A2.

La interacción transitoria entre el FvW y la GPIIb permite el “rodar” de las plaquetas en la zona dañada del vaso. Como resultado, las proteínas contenidas en la pared vascular, fundamentalmente el colágeno, inducirán la activación de las plaquetas y su adhesión firme a la pared, de tal manera que el colágeno y el FvW forman una especie de unidad funcional para la formación inicial del trombo, en el que el FvW contribuye a la captura inicial de las plaquetas en la superficie del vaso y el colágeno permite que se establezca una unión más estable con las plaquetas. En el proceso de interacción entre plaqueta y colágeno participan dos receptores plaquetarios, la GPVI y la integrina  $\alpha 2\beta 1$ <sup>6</sup>.

La activación de las plaquetas mediada por GPVI permite una firme adhesión y la secreción de las sustancias procoagulantes y proinflamatorias contenidas en ellas, lo que hace que el trombo crezca y se consolide su formación. Además, a la unión de las plaquetas al colágeno sigue la expresión de fosfatidilserina sobre la membrana plaquetaria. La fosfatidilserina proporciona actividad protrombinasa, que aumenta la

formación de trombina. Las plaquetas adheridas permanecerán vivas durante horas o días en el sitio de la lesión vascular y liberarán microvesículas con actividad proinflamatoria y protrombótica.

Después de la deposición de las plaquetas sobre el FvW y el colágeno, se requiere el reclutamiento de nuevas plaquetas desde la circulación, en un proceso conocido como **agregación plaquetaria**. Esto es posible por la acumulación local de agonistas de la activación de las plaquetas debida a su secreción desde las que ya se encuentran adheridas a la pared del vaso. Entre estos agonistas se incluyen el ADP, el TxA<sub>2</sub>, la epinefrina y la trombina. La etapa final es la activación de los receptores  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, que posibilitan la unión del fibrinógeno y también del FvW, lo que permite el establecimiento de puentes estables entre las plaquetas. En el proceso de estabilización participan también otras moléculas, como el ligando de CD40 (CD40L).

El CD40L es una GP almacenada en los gránulos plaquetarios que, tras la desgranulación plaquetaria, pasa a expresarse en la superficie de la plaqueta. Desde allí puede liberarse al plasma mediante la actividad de la metaloproteasa-2. Tanto el CD40L unido a la plaqueta como el CD40L soluble, interaccionan con el CD40, expresado en los linfocitos B, los neutrófilos, los monocitos, otras plaquetas, las células endoteliales, las células dendríticas, los fibroblastos y las células de músculo liso vascular, entre otras. No se conoce bien el papel de esta interacción CD40L-CD40, pero sí se sabe que la interacción del CD40L de la plaqueta con el CD40 de las células endoteliales estimula la expresión y la liberación de moléculas asociadas al proceso inflamatorio<sup>7</sup>. Además, la interacción del CD40L expresado en las plaquetas con las células endoteliales de origen coronario reduce la capacidad de estas de liberar óxido nítrico (NO) y aumenta el estrés oxidativo<sup>8</sup>.

### *Tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), amplificador de la activación plaquetaria*

Después de la activación inicial de las plaquetas, diferentes mecanismos cooperan para que esta activación se transmita al mayor número de plaquetas, y se produce lo que se conoce como fenómeno de reclutamiento plaquetario. Uno de estos factores cooperadores principales es el TxA<sub>2</sub>, que se sintetiza en la propia plaqueta como consecuencia de la liberación de ácido araquidónico por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub><sup>9</sup>.

El ácido araquidónico es el sustrato de la ciclooxigenasa-1 (COX-1). La COX-1 producirá endoperóxidos cíclicos de las prostaglandinas, PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> como productos iniciales, que se transformarán en TxA<sub>2</sub> por la actividad de la TxA<sub>2</sub> sintasa. El TxA<sub>2</sub>, además de activar más plaquetas, contraerá las células del músculo liso vascular.

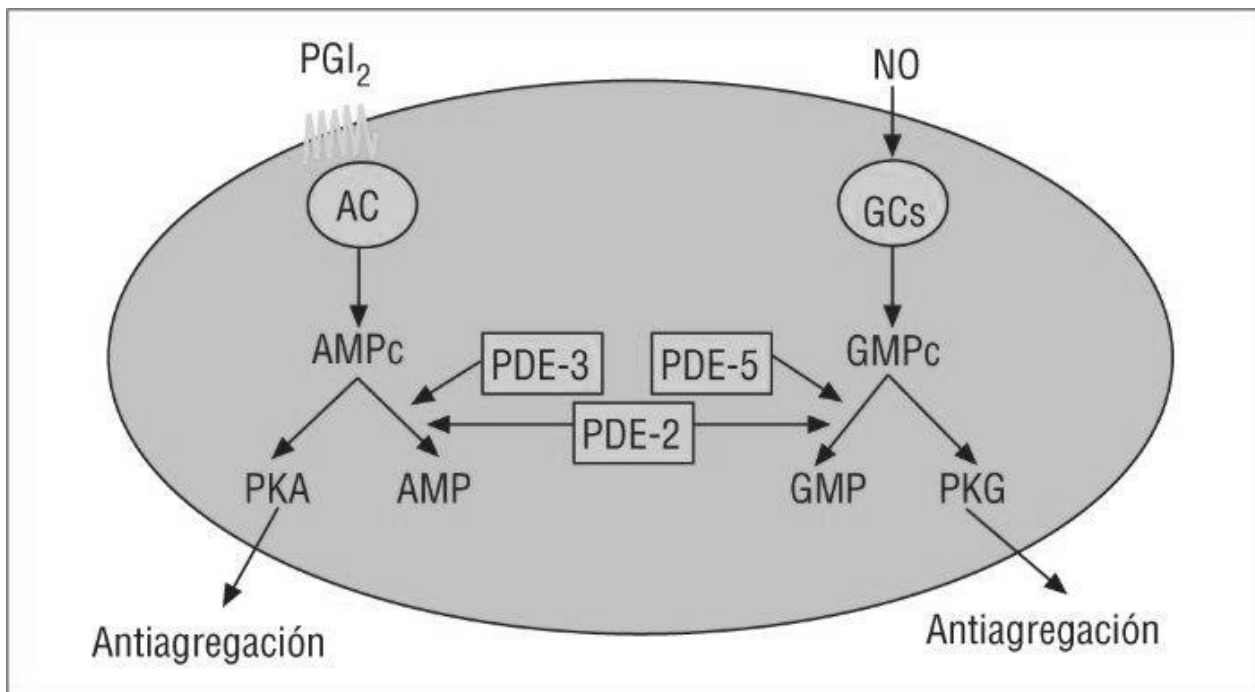
Es conocido que la inhibición de la COX-1 plaquetaria es el mecanismo principal de acción antiplaquetaria del ácido acetilsalicílico. El ácido acetilsalicílico acetila de forma irreversible la molécula de hidróxido (OH) de la serina en posición 529 de la COX-1, con lo que se inhibe la actividad de esta enzima. El resultado de que se reponga la actividad de COX-1 en las plaquetas depende de la producción de más plaquetas debido al carácter anucleado de estas, lo que las hace incapaces de generar nueva COX-1. Se calcula que cada día se generan aproximadamente un 10% del total de las plaquetas circulantes y que casi el 30% de ellas tendrán activa la COX-1 y una producción normal de TxA<sub>2</sub> en las 48h tras la última dosis de ácido acetilsalicílico<sup>10</sup>.

Probablemente, desde el punto de vista del tratamiento antiplaquetario, la inhibición de los receptores de TxA<sub>2</sub> o la actividad de la TxA<sub>2</sub> sintasa en la plaqueta tengan inicialmente una ventaja mayor que la actividad COX-1, ya que el ácido acetilsalicílico también inhibe la COX-1 endotelial que, a diferencia de la plaquetaria, libera prostaciclina, un inhibidor de la activación. Se han hecho esfuerzos para desarrollar inhibidores específicos de la TxA<sub>2</sub> sintasa; sin embargo, los resultados experimentales obtenidos han demostrado una eficiencia muy limitada en comparación con el ácido acetilsalicílico, lo que posiblemente ocurre porque al inhibirse la TxA<sub>2</sub> sintasa se

produce una acumulación de prostaciclina  $G_2$  y  $H_2$ , ambas agonistas también de los receptores de  $TXA_2$  en las plaquetas.

El ADP contribuye también a la propagación de la activación de las plaquetas. Ya hemos señalado que el ADP se libera desde los gránulos densos de las plaquetas, pero también por las células endoteliales y por los eritrocitos.

El ADP, mediante su unión a los receptores  $P2Y_{12}$ , inhibe la adenilato ciclasa y reduce la formación de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) en la plaqueta, lo que facilita su activación. El ADP, por su unión a los receptores  $P2Y_1$ , produce la activación de la fosfolipasa C. Estos dos receptores están acoplados a proteínas  $G_q$  y  $G_i$  respectivamente, lo que tiene gran importancia en el efecto del ADP en las plaquetas. Por ejemplo, el receptor  $G_q$  es el responsable del cambio de forma de la plaqueta inducido por ADP dependiente del reordenamiento de los filamentos de actina en la plaqueta acoplados a la activación de los receptores  $P2Y_1$ <sup>11</sup>.



**Figura 2.** Activación de la formación de AMPc y GMPc en la plaqueta por prostaciclina ( $PGI_2$ ) y óxido nítrico (NO), respectivamente. El AMPc estimula la proteincinasa A (PKA) y el GMPc, la proteincinasa G (PKG). A través de ambas vías de señalización se producirá la inhibición de la activación plaquetaria. La fosfodiesterasa degrada tanto el AMPc como el GMPc en el AMP y el GMP respectivamente. En las plaquetas hay tres isoformas de fosfodiesterasas (PDE): la PDE-3, que actúa fundamentalmente sobre el AMPc; la PDE-5, que actúa fundamentalmente sobre el GMPc, y la PDE-2, que actúa sobre el GMPc y el AMPc. AC: adenilato ciclasa; AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; GCs: guanilato ciclasa soluble; GMPc: monofosfato de guanosina cíclico.



El TxA<sub>2</sub> también usa como mecanismo de inhibición de la activación plaquetaria la reducción en la formación de AMPc. Sin embargo, el receptor plaquetario del TxA<sub>2</sub> no está directamente acoplado a la proteína Gi, lo que hace que el TxA<sub>2</sub> requiera la liberación de ADP para inhibir la actividad de adenilato ciclasa<sup>12</sup>.

### *Implicación de la glucoproteína IIb/IIIa en la activación de las plaquetas*

La mayoría de las GPIIb/IIIa se encuentran en la superficie plaquetaria y sólo una pequeña parte se almacena en los gránulos  $\alpha$  y en el sistema canalicular. En las plaquetas circulantes, la GPIIb/IIIa se encuentra en estado de baja afinidad, que se transforma en alta afinidad después de la activación de estas células.

La GPIIb/IIIa interviene en la adhesión a la pared vascular y también en la interacción entre varias plaquetas, fenómeno conocido como agregación plaquetaria, mediante la interacción de dos GPIIb/IIIa localizadas en plaquetas diferentes que se unirán entre sí a través del fibrinógeno.. Aunque el fibrinógeno es el ligando principal de la GPIIb/IIIa, otras moléculas como el FvW, la fibronectina y la vitronectina se unen también a la GPIIb/IIIa<sup>13</sup>.

### *Receptores de la trombina*

La trombina es el agonista plaquetario más potente que también facilita la producción de fibrina desde el fibrinógeno. Los receptores activados por la proteasa (PAR) son receptores de la trombina. El mecanismo de activación de los PAR y las señales que estimula son complejos. La trombina es una enzima, por lo que puede activar más de una molécula del receptor. Al unirse la trombina al receptor, ocurre una liberación proteolítica en la molécula del receptor, lo que produce la activación de cuatro tipos diferentes de proteínas G que estimulan señales diferentes en la célula<sup>14</sup>.

### *Mecanismos endógenos de inhibición de las plaquetas*

Existen diferentes mecanismos endógenos que pueden contrarrestar el efecto de los agonistas que inducen la activación de las plaquetas. El óxido nítrico (NO) producido por la propia plaqueta interviene en el proceso de inhibición de la agregación plaquetaria y en la reducción del reclutamiento de nuevas plaquetas al trombo formado<sup>15</sup>. En este sentido, las plaquetas de pacientes con angina inestable o infarto de miocardio producen menos NO que las plaquetas de los pacientes con angina estable, además de mostrar menos sensibilidad al NO<sup>16</sup>. Además, el ambiente prooxidante que se produce durante la fase aguda del síndrome coronario favorece una reducción en la biodisponibilidad del NO que generan otras células del entorno plaquetario, lo que reduce su efecto inhibitor sobre las plaquetas<sup>17</sup>.

Son muchos los mecanismos por los que el NO puede inhibir a las plaquetas. El segundo mensajero principal de las acciones del NO es el GMP cíclico (GMPc). El GMPc previene la activación de las plaquetas a través de al menos tres mecanismos: a) aumenta indirectamente la concentración de AMPc por inhibición de la fosfodiesterasa 3 (PDE-3); el aumento de AMPc actúa sinérgicamente con el de GMPc para inhibir la agregación plaquetaria; b) el GMPc inhibe la activación de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) que produce la activación de la GPIIb/ IIIa<sup>18</sup>, y c) el GMPc produce la fosforilación del receptor del TxA2 e inhibe su función. Además, e independientemente de la producción de GMPc, el NO inhibe la exocitosis de los gránulos densos, los lisosomas y los gránulos plaquetarios<sup>19</sup>. Se sabe que las plaquetas no activas generan cantidades de NO significativamente menores que las plaquetas activadas. En este punto hay que señalar que es muy probable que el NO liberado por la propia plaqueta no sea el principal NO que contribuya a la regulación de la actividad de estas células. Tanto el endotelio como los leucocitos circulantes, células que forman parte importante en el trombo plaquetario, también generan NO. Incluso los fármacos antiplaquetarios utilizan el NO de estas otras células para inhibir las plaquetas<sup>20,21</sup>.

La prostaciclina es otra de las moléculas endógenas que tiene una implicación directa en la regulación de la actividad plaquetaria. El producto principal derivado del ácido araquidónico en las células endoteliales es la prostaciclina producida a través del

sistema de la COX y la prostaciclina sintasa. Aunque la prostaciclina tiene un efecto vasodilatador, parece que su función fisiológica principal es reducir la activación y la agregación de las plaquetas manteniéndolas en un estado no activo. En la pared vascular, la producción mayor de prostaciclina ocurre en la superficie de la íntima y disminuye según se avanza hacia la adventicia.

En la plaqueta, la activación del receptor de prostaciclina produce la estimulación de la adenilato ciclasa plaquetaria aumentando la concentración de AMPc en la plaqueta. El aumento de AMPc permite la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) y la inhibición de la movilización de calcio y la desgranulación plaquetaria. La fosforilación de VASP se ha correlacionado con la inhibición de la GPIIb/IIIa<sup>22</sup>. En este sentido, las plaquetas deficientes en VASP tienen una mayor unión del fibrinógeno a la GPIIb/IIIa<sup>23</sup>.

### *Hiperactividad plaquetaria y marcadores plaquetarios de actividad*

No todos los pacientes tienen un estado trombótico “basal” similar. Por ejemplo, los pacientes obesos, con síndrome metabólico o diabéticos, se caracterizan por tener un estado protrombótico que puede estar motivado por un aumento en la generación de trombina, una reducción de la fibrinólisis o hiperactividad plaquetaria. Se cree que este aumento de la reactividad plaquetaria basal aumenta el riesgo de aterotrombosis. Entre las alteraciones asociadas a la hiperactividad plaquetaria observada en este tipo de pacientes, se incluye mayor sensibilidad a los agonistas que inducen adhesividad y activación plaquetaria y resistencia a la respuesta antiagregante al NO<sup>24,25</sup>.

Se ha considerado el tamaño del volumen plaquetario como un predictor independiente del evento vascular<sup>26</sup>. Sin embargo, no se conocen bien los mecanismos que favorecen la presencia de plaquetas más grandes. Algunos investigadores han apuntado que la existencia de un número elevado de plaquetas de mayor tamaño refleja la existencia de plaquetas reticuladas. Las plaquetas reticuladas son plaquetas jóvenes, con mayor

contenido de ARN mensajero, mayor número de gránulos densos y un potencial proagregante y procoagulante aumentado<sup>27</sup>.

Como ya se ha referido, la plaqueta no es la única célula involucrada en el proceso trombótico. Tanto las células endoteliales como los leucocitos y los eritrocitos participan en el proceso de formación del trombo. Otras estructuras que contienen diverso material celular proveniente de estas mismas células parecen tener una importante implicación en el proceso de la activación de la plaqueta. En particular, nos referimos a las micro partículas, fragmentos de 0,1–1µm, cuya envoltura es una porción de la propia membrana plasmática celular. Las micropartículas derivadas de las plaquetas constituyen el 70–90% de las micropartículas circulantes y el aumento de su número se ha correlacionado con mayor riesgo de trombosis arterial<sup>28</sup>.

## ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS

Dentro el arsenal de fármacos disponibles hoy en día para el manejo de la cardiopatía isquémica. Se encuentra un gran número con diferentes sitios de acción y de potencia al inhibir la agregación.

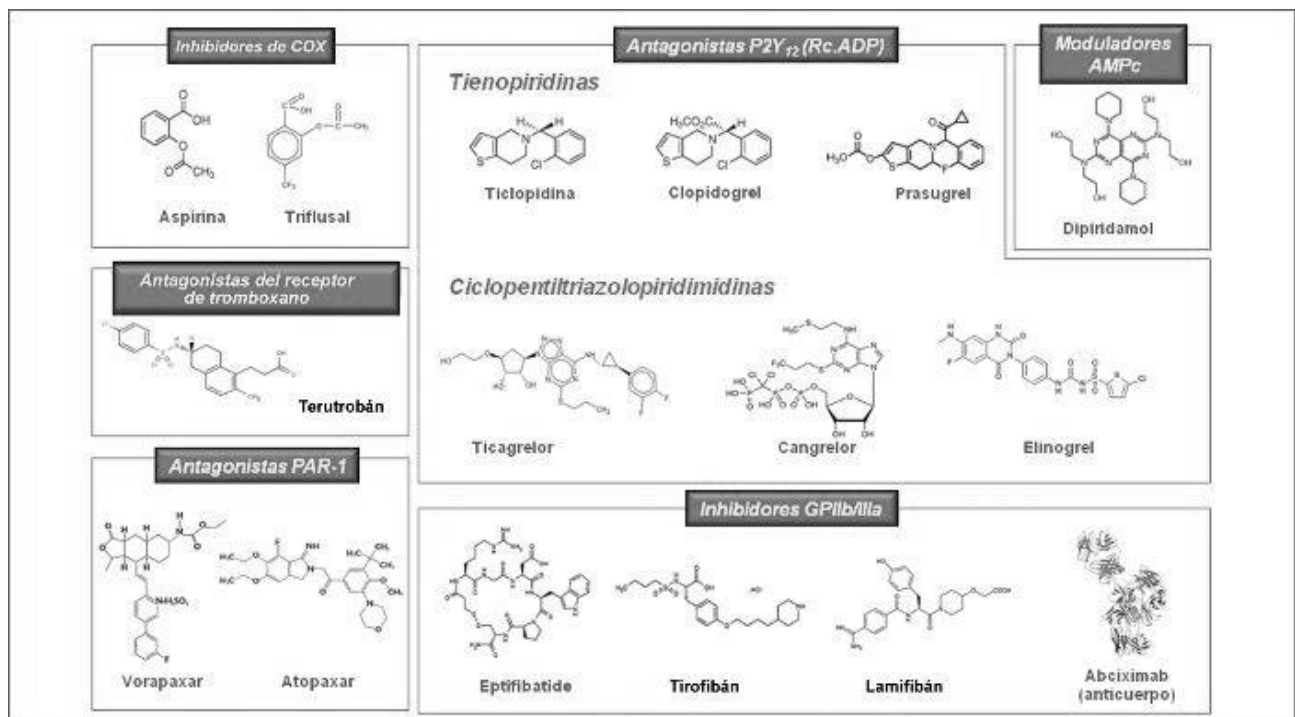
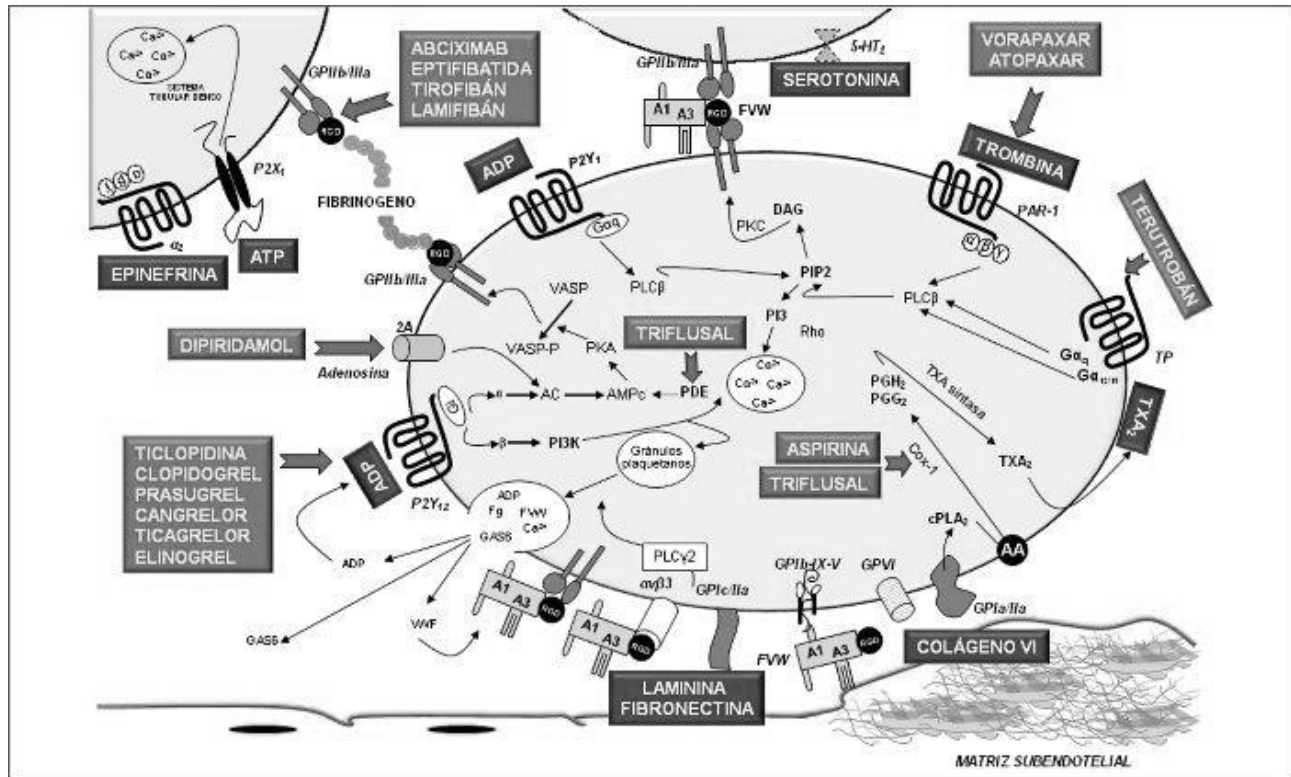


Figura 3. Estructura química de los distintos antiagregantes plaquetarios.



**Figura 4.** Principales vías de activación y agregación plaquetarias y las consiguientes dianas antiplaquetarias. AA: ácido araquidónico; AC: adenilato ciclasa; ADP: adenosindifosfato; AMP: adenosinmonofosfato; ATP: adenosintrifosfato; COX: ciclooxigenasa; DAG: diacilglicerol; FwW: factor de von Willebrand; GMP: guanidil monofosfato; IP3: 1,4,5-trifosfato; PAR: receptor activado por proteasas; PDE: fosfodiesterasas; PG: prostaglandina; PI3K: fosfatidil-inositol trifosfato; PIP2: fosfoinositol 2; PKA: proteincinasa A; PLA: fosfolipasa A2; PLC: fosfolipasa C; TP: receptor del tromboxano; TXA2: tromboxano A2.

## INHIBIDORES DE LA CICLOOXIGENASA. ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), incluido el ácido acetilsalicílico (AAS), son inhibidores de la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1) y, por lo tanto, inhiben la síntesis del tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Sin embargo, mientras que el AAS consigue una inactivación por acetilación casi completa ( $\geq 97\%$ ) y persistente ( $\geq 24\text{h}$ ) de la COX plaquetaria (isoforma COX-1), los demás AINE actúan como inhibidores reversibles de esta enzima. El AAS inhibe la COX al unirse al residuo de arginina-120 (el mismo punto de unión de los AINE) y acetilar una serina clave para la acción catalítica de la enzima (serina 529 para la COX-1 plaquetaria y serina 516 para la COX-2 endotelial) reduciendo la síntesis plaquetaria de TXA<sub>2</sub>. Otro efecto del AAS en las plaquetas es que disminuye la secreción de gránulos densos implicada en la liberación de sustancias proagregantes y vasoactivas durante la activación plaquetaria. Además, un metabolito de la aspirina, el ácido salicílico, tiene cierto efecto fibrinolítico debido a su interacción con los neutrófilos y monocitos con liberación de enzimas proteolíticas (catepsina G y elastasa). El AAS, además, tiene diversos efectos no plaquetarios, como inhibición de las prostaglandinas, inhibición de la síntesis de interleucina (IL) 6 en los leucocitos y reducción de la actividad de los inhibidores de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Todo ello, se cree, contribuye a explicar por qué sus efectos beneficiosos son mayores de lo que cabría esperar de la simple inhibición plaquetaria dependiente de un agonista relativamente débil como es el TXA<sub>2</sub>.

El AAS bloquea también la agregación secundaria inducida por la trombina, colágeno o ADP, debido a que inhibe la producción plaquetaria de diacilglicerol, aunque este efecto es menos duradero que la acción sobre la COX y es apreciable a dosis muy altas de AAS ( $> 650\text{mg/día}$ ).

A pesar de que inicialmente es recomendable una dosis de AAS de 160 mg para bloquear completamente la COX-1 plaquetaria, cantidades menores son capaces de inhibir en casi su totalidad la síntesis de TXA<sub>2</sub>. Por ello, la dosis de mantenimiento puede reducirse a 81–100mg/día de por vida.<sup>29</sup>

En cuanto al papel de la aspirina en la prevención primaria y secundaria, un reciente metaanálisis concluyó que, mientras su administración a dosis de 100–150mg/día sí

previene la presentación de enfermedades isquémicas (cardiovasculares, cerebrovasculares y arteriales periféricas) en pacientes de alto riesgo (prevención secundaria)<sup>30</sup>; no ocurre lo mismo en prevención primaria. De hecho, el beneficio del AAS se anula por el riesgo de sufrir algún evento adverso importante por el fármaco, entre los cuales figuran las hemorragias. Así, en prevención primaria, mientras el riesgo del primer infarto se reduce en un 18%, el riesgo de hemorragias extracraneales aumenta en un 54%.

Por el contrario, en prevención secundaria, el AAS se ha convertido en el antiplaquetario de referencia tras la aparición de un evento agudo y su administración debe continuarse indefinidamente, salvo que esté contraindicado por alergia, complicaciones gastrointestinales o hemorragia<sup>31</sup>. Pese a todo, la aspirina sólo reduce los eventos clínicos en un 30% aproximadamente. Es más, la aparición cada vez más frecuente de la «resistencia a la aspirina» o el también llamado «fracaso en el tratamiento con aspirina» obliga a profundizar en una mejor comprensión de sus efectos, así como a desarrollar nuevas alternativas terapéuticas. Los mecanismos implicados en esta resistencia probablemente sean multifactoriales y podrían clasificarse en factores derivados de fallo en la reducción de la síntesis de TXA2 y factores derivados de fallo en el tratamiento. La insuficiente supresión del TXA2 puede derivar de un aumento en la renovación de plaquetas (transfusiones, cirugía de revascularización coronaria), de una mayor síntesis de TXA2 de fuentes no plaquetarias (células endoteliales, monocitos/macrófagos), de la presencia de interacciones farmacológicas con otros AINE<sup>32</sup>, así como la presencia de polimorfismos genéticos (COX, TXA2 sintasa). Por otro lado, la activación plaquetaria por vías alternativas a COX-1, la reducción en la absorción, el incremento del metabolismo y la escasa adherencia al tratamiento, pueden contribuir a explicar el posible fallo del tratamiento.



## ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL ADP. CLOPIDOGREL

Múltiples evidencias experimentales indican que, de todos los agonistas liberados tras la activación plaquetaria, el ADP es uno de los más importantes para reclutar plaquetas y propagar el trombo arterial<sup>33</sup>. Las plaquetas presentan en su superficie tres receptores para el ADP, P2Y1, P2Y12 y P2X, cada uno de los cuales induce distintas vías de señalización plaquetaria y distintas funciones en la agregación plaquetaria, pero el P2Y12 es la causa última de la agregación plaquetaria persistente. Por todo ello, durante los últimos años los esfuerzos se han centrado en la investigación y desarrollo de fármacos capaces de bloquear este receptor plaquetario<sup>19</sup>. De hecho, nuevos fármacos están en fase de desarrollo y varios han llegado ya a uso clínico. Entre ellos están los nuevos inhibidores de los receptores P2Y12: prasugrel, ticagrelor, cangrelor.

El clopidogrel es un agente antiplaquetario derivado de las tienopiridinas que antagonizan la agregación plaquetaria inducida por el ADP, y es una eficaz alternativa al AAS en caso de contraindicaciones (alergias, hemorragias). Es un profármaco y por ello es necesaria la metabolización por el hígado para convertirse en fármacos activos con propiedades antiplaquetarias. El metabolito activo se une de manera covalente al residuo cisteína de uno de los receptores del ADP (P2Y12), lo que conduce a una modificación irreversible del receptor durante toda la vida de la plaqueta. En el caso del clopidogrel, también se ha demostrado que reduce la formación de conjugados plaqueta-leucocitos en pacientes con SCA<sup>34,35</sup> y la expresión de marcadores inflamatorios en plaquetas activadas como el CD40 ligando y la P-selectina en pacientes sometidos a intervencionismo coronario percutáneo (ICP)<sup>36</sup>.

El estudio CAPRIE fue el estudio de referencia que confirmó la eficacia antiplaquetaria del clopidogrel con respecto a la aspirina. Este estudio demostró que, en pacientes con historia de infarto de miocardio, infarto cerebral o enfermedad arterial periférica, el clopidogrel reducía la recurrencia de eventos isquémicos en un 8,7% respecto al AAS<sup>37</sup>. Es más, pasadas 2h tras una administración de carga de 600mg, se observaba una reducción significativa de la agregación plaquetaria, que era máxima a las 6h (40–60% de reducción). En casos de urgencia, sin embargo, ese tiempo necesario para alcanzar

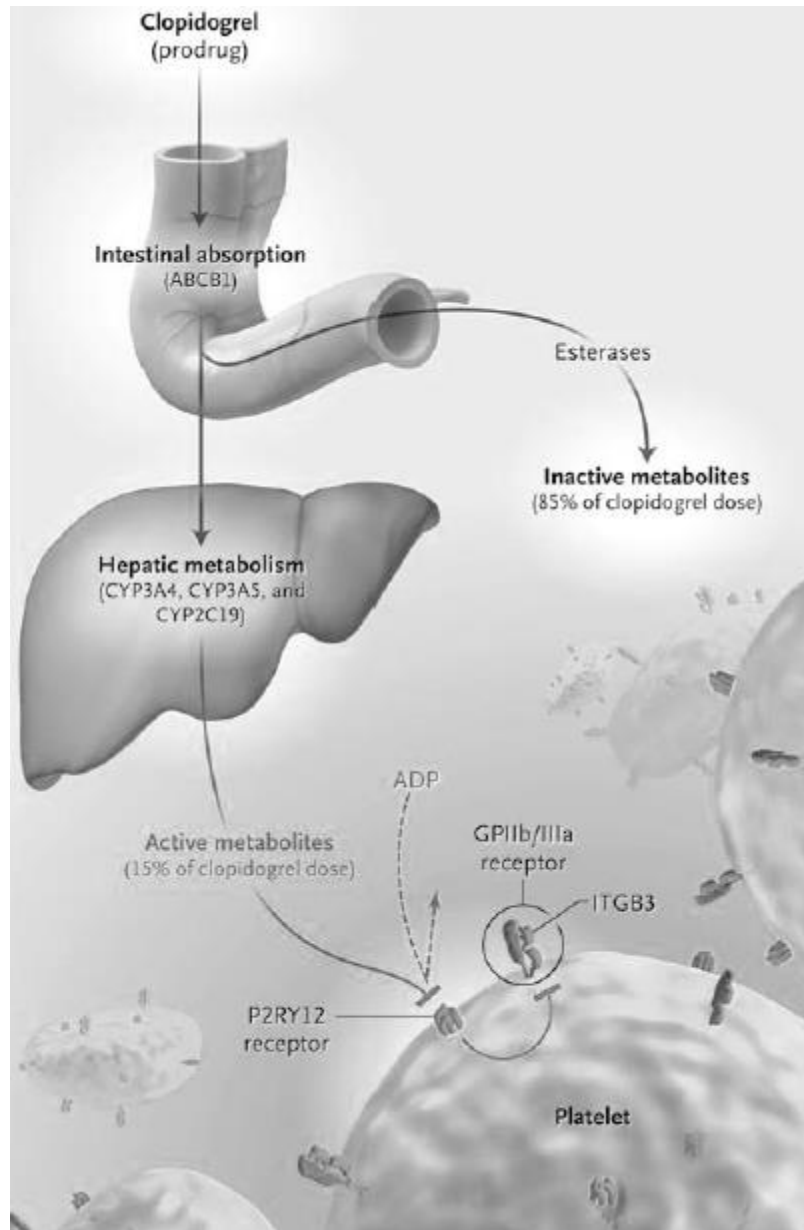
una inhibición plaquetaria óptima puede aumentar el riesgo de trombosis aguda. Se planteó la hipótesis de que unas dosis de carga mayores (900mg) acelerarían la actividad antitrombótica del fármaco y se solventaría esa limitación. Sin embargo, se demostró que las dosis de carga de 900mg no se asociaban a mayor velocidad de actuación del fármaco, pero sí a mayor tendencia a hemorragias.

Otra importante limitación del clopidogrel es la gran variabilidad interindividual detectada en cuanto a su capacidad antiagregante, la llamada “resistencia al clopidogrel”<sup>38</sup>. Incluso se ha identificado un número no despreciable de pacientes que son “no respondedores” al clopidogrel, que presentan un incremento en la incidencia de trombosis subaguda tras la implantación de un Stent. El concepto de “variabilidad de respuesta al clopidogrel” ha derivado en la preocupación de que algunos pacientes pueden no estar adecuadamente protegidos de la activación y la agregación plaquetarias y, por lo tanto, estarían expuestos a mayor riesgo de sufrir un evento trombótico<sup>39</sup>. Hay una heterogeneidad considerable en la actividad de las isoenzimas del citocromo hepático P450 en las poblaciones humanas, y se ha hecho evidente que una minoría considerable de personas (hasta un 14% en algunas series) tiene polimorfismos en CYP2C19 y en CYP3A4, que causan un deterioro del metabolismo del clopidogrel. Además, la absorción del clopidogrel está regulada por la glucoproteína-P, una proteína dependiente de energía (ATP) que actúa como una bomba extrusora de fármacos a través de las membranas y se localiza, entre otros tejidos, en las células epiteliales del intestino. Por ello, un aumento en su expresión o su función puede derivar en variaciones en la biodisponibilidad de estos fármacos. Todo ello se traduce en niveles bajos de inhibición de las plaquetas en ciertos individuos (los llamados “no respondedores”) y resulta en un aumento al triple en el riesgo de eventos adversos cardiovasculares mayores. Sin embargo, los factores que determinan la función plaquetaria y la respuesta al clopidogrel son más complejos que la respuesta debida a un sólo polimorfismo, sobre todo en el paciente individual, y si bien muchos centros realizan habitualmente pruebas genéticas para identificar a estos potenciales “no respondedores”, este enfoque personalizado no se ha traducido en mejores resultados hasta la fecha, aunque quedan estudios en curso.

Otra limitación asociada al uso de clopidogrel, especialmente en pacientes que requieren intervenciones quirúrgicas urgentes, radica en su capacidad de inhibir de manera irreversible el receptor P2Y12 al formar un puente disulfuro con este receptor, y para revertir sus efectos antiplaquetarios es necesaria la transfusión de plaquetas. Por ello, se recomienda suspender su tratamiento al menos 5 días antes de someterlo a cirugía, tiempo necesario para la suficiente renovación plaquetaria.

### *Metabolismo del clopidogrel*

El clopidogrel es un antiagregante plaquetario que se une irreversiblemente al receptor P2Y12 de las plaquetas, con lo que inhibe la agregación dependiente de ADP. Esta tienopiridina es un profármaco, que requiere dos procesos oxidativos catalizados por isoenzimas del citocromo P450 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 y CYP3A4).<sup>40,41</sup> En una primera etapa se produce un metabolito intermedio: el 2-oxo-clopidogrel, que a través de un segundo paso metabólico produce cuatro metabolitos isoméricos. Sólo el clopi-H4 es el que tiene acción antiplaquetaria *in vivo*.<sup>42</sup> Las causas de la resistencia al clopidogrel se dividen en factores dependientes de la función plaquetaria, la biodisponibilidad del fármaco, los polimorfismos del citocromo P450 y del receptor P2Y12,<sup>43</sup> así como factores extraplaquetarios que afectan la reactividad plaquetaria. De acuerdo a los polimorfismos del citocromo P450 que determinan la conversión del clopidogrel al metabolito activo, los individuos se clasifican en los siguientes grupos: metabolizadores normales (MN: CYP2C19\*1/\*1) también llamado *Wild type*, metabolizadores rápidos (MR: CYP2C19\*1/\*17), metabolizadores intermedios (MI: CYP2C19\*1/\*2), metabolizadores ultrarápidos (MUR: CYP19\*17/\*17), metabolizadores intermedio/normal (MI/N: CYP2C19\*2/\*17) y metabolizadores pobres (MP: CYP2C19\*2/\*2).



**Figura 5. Metabolismo del clopidogrel**

La absorción intestinal del pro fármaco clopidogrel está limitada por la cantidad del mismo y la llegada a bomba intestinal de P-glicoproteína codificada por el gen ABCB1. La mayoría de la profármaco se metaboliza a metabolitos inactivos por las esterasas a nivel intestinal. La minoría se bioactiva por varias isoformas del citocromo P450 (CYP) a nivel hepático. Estos metabolitos irreversiblemente antagonizan la (ADP) receptor de adenosina difosfato (codificada por el gen P2RY12), que a su vez inactiva el receptor de fibrinógeno (glicoproteína de la [GP] IIb / IIIa receptor codificado por el gen ITGB3) que participa en la agregación plaquetaria..

### *Variabilidad de la respuesta al clopidogrel*

Hay gran variabilidad interindividual en la respuesta de los pacientes al clopidogrel cuando se analiza la función plaquetaria<sup>44</sup>. A los 30 días del inicio del tratamiento antiagregante plaquetario, un subgrupo de alrededor de un 20% de los pacientes mostró un efecto inhibitor plaquetario pequeño o incluso nulo; en este subgrupo hubo un aumento del riesgo de eventos aterotrombóticos<sup>45</sup>. La observación de que los pacientes con alta reactividad plaquetaria (ARP) a pesar de los antiagregantes plaquetarios tienen mayor riesgo de eventos recurrentes ha sido corroborada en muchos estudios posteriores y actualmente hay consenso respecto a los puntos de corte para identificar a esos pacientes con cuatro pruebas de función plaquetaria (agregometría de transmisión óptica, grado de fosforilación de fosfoproteína estimulada por vasodilatadores, test de P2Y12 VerifyNow y el analizador Multiplate)<sup>46, 41</sup>.

### *Pruebas genéticas*

Los mecanismos que conducen a la gran variabilidad interindividual en el efecto antiagregante plaquetario del clopidogrel no se conocen por completo, pero se han realizado avances en determinar las bases de la variabilidad. El clopidogrel debe ser convertido al metabolito activo por la acción de múltiples enzimas hepáticas del citocromo P450, como CYP2C19, 3A4/5, 1A2, 2B6 y 2C91. La evidencia actual apunta al CYP2C19 como la enzima más importante involucrada en estos pasos de bioactivación. Los polimorfismos de nucleótido único del gen CYP2C19, con pérdida parcial o total de la función, están relacionados con diferencias en la exposición de los pacientes al metabolito activo de clopidogrel<sup>47</sup>. Concretamente, el polimorfismo génico \*2 (el más frecuente) está relacionado con una disminución de la función enzimática y una reducción de la efectividad del clopidogrel, al igual que ocurre con el polimorfismo génico \*3, menos frecuente. En un estudio<sup>48</sup> realizado en individuos sanos tratados con una dosis de carga de clopidogrel, la concentración máxima y el área bajo la curva del metabolito activo fueron un 40 y un 46% inferiores, respectivamente, en los portadores de CYP2C19\*2. El alelo de pérdida de función no es un fenómeno

infrecuente, puesto que aproximadamente de uno a dos tercios de la población caucásica y asiática, respectivamente, son portadores de al menos un alelo de pérdida de función.

En marzo de 2010, la Food and Drug Administration estadounidense introdujo la siguiente advertencia en la etiqueta del clopidogrel: “Existen pruebas para identificar el genotipo CYP2C19 de un paciente que se puede usar como ayuda para la determinación de las estrategias terapéuticas. Considere un tratamiento alternativo u otras estrategias de tratamiento en los pacientes identificados como metabolizadores lentos por CYP2C19”. Sin embargo, la American College of Cardiology Foundation y la American Heart Association emitieron una alerta clínica sobre la manera de abordar esta advertencia de la Food and Drug Administration. Dicha alerta proporciona a los clínicos una guía matizada sobre cómo abordar esta advertencia de la etiqueta del clopidogrel y se muestra reticente ante la determinación sistemática del genotipo como ayuda para el juicio clínico<sup>49</sup>, principalmente porque el tratamiento antiagregante plaquetario guiado por el genotipo no se ha estudiado en un test clínico aleatorizado a gran escala.

### *Trascendencia clínica*

La cuestión importante es determinar la relevancia de los polimorfismos genéticos del CYP2C19 para la práctica clínica diaria. Un metaanálisis de la asociación entre los alelos de pérdida de función del CYP2C19 y los eventos cardiovasculares adversos mayores (MACE, por sus siglas en inglés) en pacientes tratados con clopidogrel y predominantemente con ICP (nueve estudios, con un total de 9.685 pacientes) puso de manifiesto que los pacientes portadores de 1 o 2 alelos de pérdida de función, principalmente el polimorfismo génico \*2, tenían un riesgo de MACE superior al de los no portadores, con razón de riesgos (HR)=1,55 (p=0,01) y HR=1,76 (p=0,002), respectivamente. Por otra parte, para la trombosis del stent en los portadores de 1 o 2 alelos de pérdida de función fueron HR=2,67 (p<0,0001) y HR=3,97 (p=0,01), respectivamente<sup>50</sup>.

Sin embargo, los análisis post-hoc genéticos de los test PLATO, CURE y ACTIVE-A<sup>51,52</sup>, no se incluyeron en el metaanálisis realizado por Mega et al<sup>50</sup>. Con una población en la que solamente un 64% de los pacientes fueron tratados con ICP, el estudio PLATO sólo mostró un efecto del alelo de pérdida de función del CYP2C19 en los MACE a los 30 días (HR=1,37; p=0,028). En los test ACTIVE-A y CURE no se observaron correlaciones significativas.

Si los polimorfismos genéticos del CYP2C19 desempeñan realmente un papel importante en el efecto antiagregante plaquetario del clopidogrel, ¿por qué no se observa este resultado en esos test clínicos importantes? En el estudio de Tello-Montoliu et al<sup>53</sup>, se examinó a 40 pacientes con cardiopatía isquémica estables que recibían un doble tratamiento antiagregante plaquetario para determinar el genotipo CYP2C19 \*2 y \*17 y la reactividad plaquetaria durante el tratamiento, mediante agregometría de transmisión óptica y pruebas de fosfoproteína estimulada por vasodilatadores. En la agregometría de transmisión óptica no se observaron diferencias significativas entre los individuos con el tipo natural (wild) y los polimórficos. En la prueba de fosfoproteína estimulada por vasodilatadores, los pacientes portadores de \*2 mostraron un aumento del índice de reactividad plaquetaria (el 72,3±11,9% frente al 56,1±18,8%; p=0,02), y los pacientes portadores de \*17 presentaron una disminución del índice de reactividad plaquetaria (el 51,3±17,8% frente al 63,8±18,0%; p=0,048).

Hasta el momento, no se ha demostrado ninguna correlación entre los polimorfismos genéticos del CYP2C19 y los objetivos clínicos de valoración en pacientes de bajo riesgo. Solamente los test que incluyen a un número elevado de pacientes de alto riesgo, es decir, grupos de pacientes con IAM con elevación del segmento ST (IAMCEST) e ICP, muestran un aumento de la tasa de MACE en los portadores de alelos de pérdida de función del CYP2C19. Así pues, el efecto podría no haberse apreciado en los test ACTIVE-A y CURE a causa de la población de riesgo relativamente escasa y el bajo porcentaje de pacientes tratados con una ICP (18%). Los resultados significativos del estudio PLATO a los 30 días podrían deberse al aumento

del riesgo de eventos relacionados con la intervención en los primeros días siguientes a una ICP.

### *Riesgo hemorrágico*

En el otro extremo del espectro antiagregante plaquetario, en el que los polimorfismos de \*2 y \*3 desempeñan su papel de pérdida de función, los pacientes portadores de la variante génica CYP2C19\*17 presentan un aumento del metabolismo de clopidogrel en comparación con los no portadores. En estos pacientes el CYP2C19\*17 actúa como alelo de ganancia de función, y ello podría comportar unas tasas de eventos aterotrombóticos inferiores, pero también un aumento del riesgo de hemorragia. En los pacientes con IAMCEST, se observó relación entre el estado de portador de \*17 y la reducción de los MACE, pero en otros subgrupos de pacientes este efecto no está claro todavía<sup>54</sup>. Serán necesarios más estudios para establecer si la determinación del genotipo \*17 es útil en la práctica clínica diaria.



## **ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO ALTERNATIVAS**

En los pacientes con actividad residual plaquetaria alta se han buscado alternativas. Tal es el caso de aumentar al doble la dosis de clopidogrel en esos pacientes, pero la dosis doble no mostró efecto beneficioso en la población de ICP de bajo riesgo del estudio GRAVITAS<sup>55</sup>. Una alternativa sería el empleo de un fármaco antiagregante plaquetario más potente, como prasugrel o ticagrelor, que no se afectan por la genética del CYP.

## **MEDICINA ANTIAGREGANTE PLAQUETARIA INDIVIDUALIZADA**

Sabiendo que la respuesta antiagregante plaquetaria al prasugrel y al ticagrelor no se ve influida por los polimorfismos del gen CYP2C19 y que estos fármacos han sido más eficaces que el clopidogrel en comparaciones directas, surge la pregunta de ¿por qué no prescribir uno de estos fármacos más efectivos?. Se ha demostrado que las pruebas de la función plaquetaria tienen un valor predictivo negativo muy elevado (> 93%), que hace que los pacientes con reactividad plaquetaria normal durante el tratamiento con clopidogrel tengan un riesgo muy bajo de episodios aterotrombóticos recurrentes<sup>41</sup>. La administración de antiagregantes plaquetarios más potentes a esos pacientes de bajo riesgo no reduciría probablemente el riesgo trombótico, pero elevaría el riesgo de hemorragias. Además, con la disponibilidad de clopidogrel genérico, y su uso más generalizado en comparación con el uso de prasugrel o ticagrelor implicaría un enorme aumento de los costes de medicación.

El régimen de tratamiento estandarizado para todos parece no tener lugar hoy en día y está siendo reemplazado por el tratamiento antiagregante plaquetario individualizado, basado en los factores de riesgo específicos de cada paciente para los eventos aterotrombóticos, como ARP, diabetes mellitus, SCA y estado de portador de CYP2C19. La prescripción de prasugrel o ticagrelor únicamente a los pacientes de alto riesgo podría conducir a una nueva era de medicina individualizada

# DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

---

El clopidogrel actualmente es el segundo fármaco más frecuentemente utilizado en la cardiopatía isquémica en el mundo y en México por su efecto inhibitorio en la actividad plaquetaria.

La resistencia al clopidogrel es considerada multifactorial con implicaciones en la presentación de complicaciones y eventos adversos.

El conocimiento de las alteraciones en el metabolismo por polimorfismos, está bien definido, pero es importante conocer dicha presentación y la relación de esta con medición de la actividad plaquetaria residual, que existe en nuestra población.

# JUSTIFICACIÓN

---

El propósito de este trabajo es conocer la prevalencia de los polimorfismos del citocromo P450 CYP2C19 que podrían condicionar la respuesta variable al clopidogrel en una población de pacientes mexicanos con cardiopatía isquémica.

También se desea conocer la asociación con la reactividad plaquetaria residual y los polimorfismos favorables y desfavorables para el metabolismo del clopidogrel

# PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

---

¿Cuál es la asociación entre los polimorfismo favorables y desfavorables para el metabolismo del clopidogrel del CYP2C19, con la medición de la reactividad plaquetaria residual, en la población mexicana?

# HIPÓTESIS

---

**H1:** Los polimorfismos favorables para el metabolismo del clopidogrel, definidos como el CYP2C19 \*1/\*1, CYP2C19 \*1/\*17, CYP2C19 \*17/\*17 presentan menor actividad residual plaquetaria que el grupo considerado como polimorfismos desfavorables, que corresponden CYP2C19 \*1/\*2, CYP2C19 \*2/\*17, CYP2C19 \*2/\*2, medido por agregometría plaquetaria

**H0:** Los polimorfismos favorables para el metabolismo del clopidogrel, definidos como el CYP2C19 \*1/\*1, CYP2C19 \*1/\*17, CYP2C19 \*17/\*17, presentan igual o mayor actividad residual plaquetaria que el grupo considerado como polimorfismos desfavorables, que corresponden CYP2C19 \*1/\*2, CYP2C19 \*2/\*17, CYP2C19 \*2/\*2, medido por agregometría plaquetaria.

# OBJETIVOS

---

## Objetivo general

Conocer la relación que existe entre los diferentes polimorfismos de CYP2C19 para el metabolismo del clopidogrel y la reactividad plaquetaria residual, en pacientes del Instituto Nacional de cardiología Ignacio Chávez

## Objetivos secundarios

1. Conocer la prevalencia de los polimorfismos de CYP2C19 en pacientes con enfermedad cardiovascular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

# MATERIAL Y METODOS

---

## **Diseño del estudio**

Estudio descriptivo transversal.

## **Descripción de la población de estudio**

### *Población objetivo*

Pacientes con enfermedad cardiovascular que se encuentren en seguimiento en el instituto nacional de cardiología y se encuentren en tratamiento anti agregante plaquetario con clopidogrel.

### *Población elegible*

Pacientes con cardiopatía isquémica o enfermedad vascular cerebral. Tras tres a doce meses después de haber sufrido un síndrome coronario agudo o un episodio de isquemia cerebral transitoria o infarto cerebral. Que se encuentren con un consumo de clopidogrel de manera regular.

### *Criterios de inclusión*

- Sujetos de ambos géneros
- Mayores de 18 años sin límite superior de edad
- Antecedente de enfermedad cardiovascular y vascular cerebral
- Tratamiento al momento de la toma con clopidogrel y la ingesta de este debe ser continua por lo menos en el último mes.
- Firmar consentimiento informado

### *Criterios de exclusión*

- No dar su conocimiento
- Pérdida de la viabilidad de la muestra



# METODOLOGIA

---

Se estudiaron 171 enfermos con indicación de recibir tratamiento antiplaquetario: 160 con cardiopatía isquémica y 11 con enfermedad vascular cerebral. Los enfermos se captaron de 3 a 12 meses después de haber sufrido un síndrome coronario agudo o un episodio de isquemia cerebral transitoria o infarto cerebral. A cada enfermo se le aplicó un interrogatorio y se revisó el expediente clínico para recabar los datos demográficos, el diagnóstico, los factores de riesgo cardiovascular y las enfermedades asociadas. Se les tomó una muestra de sangre venosa para la obtención del DNA y determinar los polimorfismos relacionados con la respuesta al clopidogrel.

## Determinación de los polimorfismos

En una primera etapa se separó el concentrado de leucocitos y se congeló hasta el momento de separación del DNA y el análisis de los polimorfismos. La extracción del ADN genómico se realizó con QIAamp® blood ADN, mini y maxi kit (QIAGEN Inc, CA, EE.UU.), el DNA se eluyó en amortiguador TE para DNA (Teknova Inc Hollister, CA). Las muestras de DNA se cuantificaron en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE USA) y diluyeron en agua grado biología molecular. El genotipo de los alelos 2, 3 y 17 de CYP2C19, se determinó por ensayos de discriminación alélica punto final con sondas TaqMan (Applied Biosystems) y TaqMan GT Master Mix (Applied Biosystems) en un termociclador *7900 HT fast real time PCR System (Applied Biosystems)*. En un estudio previo se conformó el genotipo CYP2C19 por secuenciación bidireccional, utilizando *primer locus específico*. En este estudio, hemos preparado una nueva dilución y reanalizando un 30% las muestras.

## Pruebas de agregación plaquetaria

De los 171 individuos estudiados, a 83 se les practicó agregometría plaquetaria con el objeto de investigar la sensibilidad o resistencia al tratamiento con clopidogrel. Se colectó sangre venosa y se depositaron 4.5 mL en tubos de polipropileno que contenían citrato de sodio al 3.2% en una proporción 9:1. La agregometría plaquetaria se realizó dentro de las primeras 2 horas por el método original de Born, en un Lumi-agregómetro marca Chrono-Log de dos canales modelo *Whole blood Lumi-aggregometer (Ca<sup>2+</sup>)*, de acuerdo a estándares aceptados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* publicados en 2008.<sup>56</sup> El plasma abundante en plaquetas (PAP) se obtuvo por centrifugación corta y lenta (140g) por 5 minutos y se ajustó a una cuenta de 250,000 plaquetas/ $\mu$ L con plasma pobre en plaquetas autólogo (PPP) obtenido por centrifugación a 1000g por 15 minutos. Para calcular el porcentaje de agregación máxima (PAM), se utilizó la agregación máxima (AM) en unidades arbitrarias de una mezcla de muestras obtenidas de al menos seis donadores sanos voluntarios que no tomaron medicamento alguno. La agregación se indujo con adenosín difosfato (ADP) 10 $\mu$ M de la marca Chrono-Phar, utilizado según las indicaciones del fabricante. La respuesta al clopidogrel se estableció de acuerdo a los valores de referencia de la agregación plaquetaria inducida por ADP 10 $\mu$ M (80-120%) en la población sana sin tratamiento antiagregante: se definió sensibilidad con PAM < 60.0% y resistencia con PAM  $\geq$  60%.

# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

Las variables continuas se analizaron de acuerdo a su modelo de distribución por pruebas paramétricas (ANOVA) y no paramétricas (U de Mann Whitney) según el caso. La diferencia entre proporciones de variables categóricas por sexo y sensibilidad al clopidogrel, se analizó por la prueba de  $\chi^2$  de Pearson y cuando fue necesario, por la prueba exacta de Fisher. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando se obtuvo una  $p < 0.05$  (dos colas).

# RESULTADOS

---

## Características de la población estudiada:

De los 171 enfermos estudiados, 160 tenían enfermedad arterial coronaria (93.6%) y 11 tenían enfermedad vascular cerebral (6.4%). Las características demográficas aparecen en la tabla 1. Como se puede observar, se reclutaron 147 hombres (85.9%) y 24 mujeres (14.1%), con una edad promedio de 55.3 años ( $\pm$  11.9), y 56.1 años ( $\pm$  13.2) respectivamente.

Los diagnósticos fueron infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST: 66.3%; infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST: 13.7 %; angina inestable: 8.1% y angina estable: 11.9%. Del total de enfermos con cardiopatía isquémica, el 73.1% había sido sometido a angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) y 16.9% habían sido sometidos a cirugía de revascularización coronaria. De los pacientes sometidos a angioplastia, el 88.9% tenían colocado por lo menos una endoprótesis coronaria y al resto se les había practicado una angioplastia con balón. Entre los factores de riesgo coronario, se encontró dislipidemia en el 65.5%, hipertensión arterial en el 62%, antecedentes de tabaquismo en el 57.3%, diabetes mellitus tipo 2 en el 27.5% y obesidad en el 26.3%. De los enfermos con cardiopatía isquémica (160), 62 (38.75%) se encontraban en tratamiento sólo con aspirina 100 mg/d y 96 (60%) con aspirina 100 mg/d y clopidogrel 75 mg/d en el momento del estudio.

|                                      | <b>TOTAL</b>     | <b>HOMBRES</b>  | <b>MUJERES</b> | <b>P</b>                 |
|--------------------------------------|------------------|-----------------|----------------|--------------------------|
| <b>N</b>                             | 171              | 147             | 24             |                          |
| <b>Edad promedio</b>                 | 55.47 ± 12.08    | 55.36 ± 11.93   | 56.16 ± 13.24  | <b>0.763</b>             |
| <b>Tabaquismo*</b>                   | 98/171 (57.3 %)  | 94/147 (63.9 %) | 4/24 (16.7 %)  | <b>&lt;0.001**</b>       |
| <b>Diabetes mellitus</b>             | 47/171 (27.5 %)  | 41/147 (27.9 %) | 6/24 (25.0 %)  | <b>1.0</b>               |
| <b>HTA</b>                           | 106/171 (62.0 %) | 87/147 (59.2 %) | 19/24 (79.2 %) | <b>0.062</b>             |
| <b>Dislipidemia</b>                  | 112/171 (65.5%)  | 94/147 (63.9%)  | 18/24 (75.%)   | <b>0.359</b>             |
| <b>Obesidad</b>                      | 45/171 (26.3 %)  | 41/147 (27.9 %) | 4/24 (16.7%)   | <b>0.322</b>             |
| <b>EVC</b>                           | 11/171 (6.4 %)   | 9/147 (6.12 %)  | 2/24 (8.3 %)   | <b>0.654</b>             |
| <b>TIPO DE CARDIOPATIA ISQUEMICA</b> |                  |                 |                |                          |
| <b>IAM c/elev ST</b>                 | 106/160 (66.2%)  | 96/138 (69.5%)  | 10/22 (45.4%)  | <b>0.026<sup>#</sup></b> |
| <b>IAM s/elev ST</b>                 | 22/160 (13.7%)   | 18/138 (13.0%)  | 4/22 (18.2%)   | <b>0.516</b>             |
| <b>Angina Inestable</b>              | 13/160 (8.1%)    | 10/138 (7.2%)   | 3/22 (13.6%)   | <b>0.308</b>             |
| <b>Angina estable</b>                | 19/160 (11.9%)   | 14/138 (10.1%)  | 5/22 (22.7%)   | <b>0.09</b>              |
| <b>RV coronaria</b>                  | 27/160 (16.9%)   | 23/138(16.7%)   | 4/22(18.2%)    | <b>0.86</b>              |
| <b>ACTP</b>                          | 117/160 (73.1%)  | 107/138 (77.5%) | 10/22 (45.4%)  | <b>0.002</b>             |
| <b>Stent</b>                         | 104/117 (88.9%)  | 95/107 (88.8%)  | 9/10 (90.0%)   | <b>0.907</b>             |
| <b>Balón</b>                         | 13/117 (11.1 %)  | 12/107 (11.2%)  | 1/10 (10.0 %)  | <b>1.0</b>               |

**Tabla 1. Población estudiada**

Diferencia entre proporciones por prueba de Chi<sup>2</sup>. \*Tabaquismo positivo considera fumadores activos y exfumadores.  
 \*\*Prueba exacta de Fisher. <sup>#</sup>IAM con elevación ST contra cualquier otro SICA

## Prevalencia de los polimorfismos del CYP2C19

Entre los 171 enfermos estudiados, el polimorfismo más frecuente (62.6%) fue el CYP2C19\*1/\*1 (MN). El segundo en frecuencia (19.9%) fue el polimorfismo CYP2C19 \*1/\*17 (MR). El polimorfismo CYP2C19 \*1/\*2 (MI) correspondió al 12.3% y los menos frecuentes fueron el CYP2C19 \*2/\*17 (MI/N) en el 2.3%, el CYP2C19 \*2/\*2 (MP) en el 2.3%. El más raro fue el CYP2C19 \*17/\*17 (MUR), que se encontró en 0.6%. Tabla 2. En la tabla 3 se muestran las características y frecuencia de los alelos del CYP2C19.

Los polimorfismos CYP 2C19 \*1/\*1, CYP2C19 \*1/\*17 y CYP 2C19 \*17/\*17, en los que se esperaría una adecuada concentración plasmática de clopidogrel, comprenden el 83.1% de los enfermos estudiados. Por el contrario, los polimorfismos CYP2C19 \*1/\*2, CYP2C19 \*2/\*17 y CYP 2C19 \*2/\*2, que corresponderían a las concentraciones bajas del metabolito activo del clopidogrel, representan sólo el 17% de los individuos estudiados.

| POLIMORFISMOS  | TOTAL<br>N=171 (100%) | HOMBRES<br>N=147 (86.0%) | MUJERES<br>N=24 (14.0%) |
|--|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>Metabolizador normal (Wild Type)<br/>CYP2C19*1/*1</b> | <b>107 (62.6%)</b>    | 90 (61.2%)               | 17 (70.8%)              |
| <b>Metabolizador rápido<br/>CYP2C19*1/*17</b>            | <b>34 (19.9%)</b>     | 30 (20.4%)               | 4 (16.7%)               |
| <b>Metabolizador intermedio<br/>CYP2C19*1/*2</b>         | <b>21(12.3%)</b>      | 19 (12.9%)               | 2 (8.3%)                |
| <b>Metabolizador ultra-rápido<br/>CYP2C19*17/*17</b>     | <b>1 (0.6%)</b>       | 1 (0.7%)                 | 0                       |
| <b>Metabolizador intermedio/normal<br/>CYP2C19*2/*17</b> | <b>4 (2.3%)</b>       | 3 (2.0%)                 | 1 (4.2%)                |
| <b>Metabolizador pobre<br/>CYP2C19*2/*2</b>              | <b>4 (2.3%)</b>       | 4 (2.7%)                 | 0                       |

Tabla 2. Prevalencia de los polimorfismos del CYP2C19 en la población estudiada.

Diferencia entre proporciones por prueba Chi<sup>2</sup> de Pearson, todos contra MN.

| Alelo de CYP2C19 | Frecuencia alélica | Referencia del SNP | Efecto en el metabolismo de la enzima |
|------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------------|
| *1               | 78.65 (n=269)      | No aplica          | Normal                                |
| *2               | 9.6 (n=33)         | rs4244285          | Inactiva                              |
| *3               | 0 (n=0)            | rs4986893          | Inactiva                              |
| *17              | 11.7 (n=40)        | rs12248560         | Incrementada                          |

Tabla 3. Características y frecuencia de los alelos del citocromo P450 2C19.

### Grupos de respuesta y resistencia al tratamiento antiplaquetario

La relación entre los polimorfismos del CYP2C19 y la sensibilidad o la resistencia al clopidogrel se analizó en los 83 enfermos que contaban con estudio de agregación plaquetaria. Tabla 4. Se encontraron 45 enfermos sensibles (54.2%) y 38 enfermos resistentes (45.8%). Entre los enfermos MN (47) (*wild type*), el 53.2% fueron sensibles y 46.8% fueron resistentes al clopidogrel. Entre los MR (16), la mayoría 81.2% fueron sensibles y sólo 18.8% resistentes al clopidogrel. Entre los MI (12), la mayoría (66.6%) fueron resistentes al clopidogrel. El único paciente MUR, como era de esperarse, resultó sensible al clopidogrel (PAM 38%). Entre los MI/N (3), también se encontró 66.6% de resistencia. De los cuatro enfermos MP, tres (75%) fueron resistentes al clopidogrel. El cuarto enfermo tenía una agregación plaquetaria de 6 decimales por abajo del punto de corte que define resistencia o sensibilidad, lo que indica que no es un individuo con evidente respuesta al clopidogrel.

| POLIMORFISMOS   | TOTAL<br>N= 83 (100%) | SENSIBLES<br>N= 45 (54.2%) | RESISTENTES<br>N= 38 (45.8%) |
|---|-----------------------|----------------------------|------------------------------|
| <b>Metabolizador normal<br/>(Wild Type) (MN)<br/>CYP2C19*1/*1</b>   | 47 (56.6%)            | 25/47 (53.2%)              | 22/47 (46.8%)                |
| <b>Metabolizador rápido (MR)<br/>CYP2C19*1/*17</b>                  | 16 (19.3%)            | 13/16 (81.2%)              | 3/16 (18.8%)                 |
| <b>Metabolizador intermedio<br/>(MI)<br/>CYP2C19*1/*2</b>           | 12 (14.5%)            | 4/12 (36.4%)               | 8/12 (66.6%)                 |
| <b>Metabolizador ultra-rápido<br/>(MUR)<br/>CYP2C19*17/*17</b>      | 1 (1.2%)              | 1 (100%)                   | 0                            |
| <b>Metabolizador<br/>intermedio/normal (MI/N)<br/>CYP2C19*2/*17</b> | 3 (3.6%)              | 1/3 (33.4%)                | 2/3 (66.6%)                  |
| <b>Metabolizador pobre (MP)<br/>CYP2C19*2/*2</b>                    | 4 (4.8%)              | 1/4 (25.0%)*               | 3/4 (75.0%)                  |

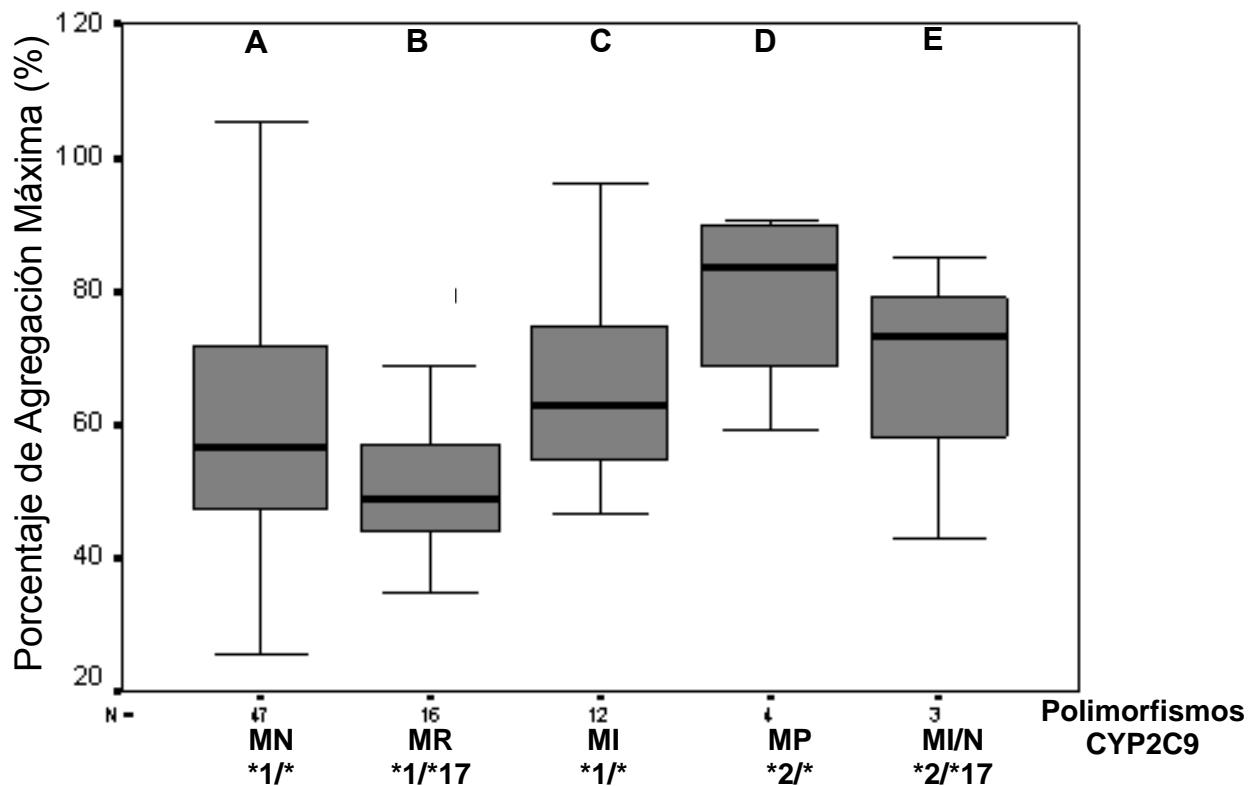
Sensibles: PAM < 60.0%, Resistentes: PAM ≥ 60.0.

Tabla 4. Distribución de los polimorfismos del CYP2C19 en los enfermos con agregación plaquetaria inducida con ADP 10  $\mu$ Mol.



## Diferencias en la agregación plaquetaria máxima de acuerdo al polimorfismo

La figura 1 muestra la distribución del porcentaje por cuartiles de agregación máxima inducida por ADP de acuerdo al polimorfismo. Como se puede observar, entre los MN (A), la PAM expresada en mediana y cuartiles (percentilas 25 y 75) fue de 56.5% (27.3% – 72.1%). Entre los MR (B) se observó una PAM 49.1% (44.2% - 58.4%). El único paciente MU (no se muestra en la figura) tuvo 38.0% de PAM. El grupo de MI (C) tuvo una PAM de 62.9% (52.8% - 74.9%). En contraste en el grupo de MP (D) la PAM fue de 83.4% (64.4% - 90.2%), lo que indica un escaso efecto inhibitorio. En el grupo MI/N (E) la PAM fue de 73.2% (43.1%- 84.9%). Se encontró diferencia significativa (prueba U de Mann Whitney) entre los MN y los MP ( $p = 0.022$ ), entre el MR y el MI ( $p = 0.013$ ) y entre el MR y MP ( $p = 0.007$ ).



Prueba LSD para diferencia de medias entre grupos por genotipo:  
Grupo 1/1 vs 2/2  $p=0.013$   
Grupo 1/17 vs 1/2  $p=0.026$ ,  
Grupo: 1/17 vs 2/2  $p=0.003$ .

**Figura 6.** Distribución de PAM por grupos de polimorfismos del CYP2C19. Agregación conADP 10  $\square$ M. Se muestran: mediana y cuartiles de acuerdo al genotipo.

## **Análisis por grupos de polimorfismos favorables o desfavorables para el metabolismo del clopidogrel**

Entre los 83 enfermos que contaban con agregometría plaquetaria y polimorfismos, integramos 2 grupos: Grupo A, que consideramos favorables para el metabolismo del clopidogrel (CYP2C19 \*1/\*1, CYP2C19 \*1/\*17, CYP2C19 \*17/\*17) y Grupo B los que consideramos tenían polimorfismos desfavorables para el metabolismo del clopidogrel (CYP2C19 \*1/\*2, CYP2C19 \*2/\*17, CYP2C19 \*2/\*2). En el Grupo A se reunieron 64 enfermos (77.1%) lo que indica que la mayoría de la población representada en este estudio tiene un buen sustrato genético para la respuesta al clopidogrel. La mayoría de ellos, 39 individuos que representan el 60.9% de este grupo, resultaron sensibles por agregometría plaquetaria, y sólo el 39.1% mostraron resistencia. El Grupo B quedó integrado por 19 enfermos, lo que indica que el 22.9% de la población estudiada tiene polimorfismos desfavorable para el metabolismo del clopidogrel. La mayoría de los individuos de este grupo (68.4%) resultaron resistentes y sólo 31.6% mostraron sensibilidad al clopidogrel.

# DISCUSION

---

En este trabajo encontramos que la prevalencia de los polimorfismo del citocromo CYP2C19 en nuestro medio es similar a la reportada en otros grupos raciales. Por ejemplo, entre los iraníes la prevalencia del CYP2C19 \*1/\*1 es del 74%, CYP2C19 \*1/\*2 del 25% y del CYP2C19 \*2/\*2 del 0.6%.<sup>57</sup> En los italianos la prevalencia del CYP2C19 \*1/\*1 es del 79.4%, CYP2C19 \*1/\*2 del 18.8%% y del CYP2C19 \*2/\*2 del 0.0%.<sup>58</sup> Un grupo colombiano reportó una prevalencia de CYP2C19 \*1/\*1 del 83.5%, CYP2C19 \*1/\*2 del 15.3% y del CYP2C19 \*2/\*2 del 1%.<sup>59</sup> En la India se reportó una prevalencia del CYP2C19 \*1/\*1 del 35%, CYP2C19 \*1/\*2 del 55% y del CYP2C19 \*2/\*2 del 10%.<sup>60</sup> Entre los rusos la prevalencia reportada del CYP2C19 \*1/\*1 es del 76.6%, CYP2C19 \*1/\*2 del 19% y del CYP2C19 \*2/\*2 del 1.7%.<sup>61</sup>

El polimorfismo más frecuente en nuestra población estudiada es el CYP2C19 \*1/\*1 que corresponde al metabolizador normal, seguido del CYP2C19 \*1/\*17 que corresponde al metabolizador rápido y el CYP2C19 \*1/\*2 o metabolizador intermedio. Los primeros dos polimorfismos están asociados a una concentración adecuada del metabolito activo del clopidogrel y se encuentran presentes en el 82.5% de nuestra población (tabla2). Ello indica que la mayoría de los enfermos a los que se les administra clopidogrel en nuestro medio tienen un sustrato genético adecuado para producir el metabolito activo del fármaco. El polimorfismo CYP2C19 \*2/\*2, que corresponde al metabolizador pobre, sólo lo encontramos en el 2.3% de los enfermos, lo que indica que es la minoría de la población que recibe clopidogrel, la que podrían tener concentraciones bajas del metabolito activo.

La prevalencia de los polimorfismos relacionados con un pobre metabolismo del clopidogrel (CYP2C19 \*1/\*2, CYP2C19 \*2/\*17 y CYP 2C19 \*2/\*2) fue mayor en el grupo de enfermos resistentes que en el grupo de los sensibles (34.2% vs 13.3%), tabla 4. Entre los 47 individuos con polimorfismos CYP2C19 \*1/\*1 (MN), encontramos 22 (46.8%) con agregación plaquetaria > 60% (resistentes); ello indica que, a pesar de que

podieran tener una concentración plasmática adecuada del metabolito activo del clopidogrel, no logran una inhibición plaquetaria adecuada. Como podemos observar, la presencia de estos polimorfismos no explica el total de los casos de resistencia y apoya la idea de que existen otras causas.

Es de suponer que existen otros factores involucrados en la resistencia al clopidogrel en nuestros pacientes; como la inflamación, PCR, fibrinógeno, tabaquismo, control glucémico entre otros los cuales no fueron analizados en este estudio. Se ha descrito un alto consumo y recambio plaquetario en diversos tipos de trombosis,<sup>62,63</sup> incluyendo la aterosclerosis, debido a que las plaquetas jóvenes muestran mayor actividad hemostática.<sup>64</sup> También se ha encontrado hiperreactividad plaquetaria en otras entidades asociadas a infarto agudo del miocardio, como la ectasia coronaria,<sup>65</sup> así como asociada a tabaquismo, diabetes mellitus y eventos trombóticos agudos venosos como arteriales.<sup>66</sup>

También se ha comunicado que la reactividad plaquetaria elevada durante el tratamiento con clopidogrel es un predictor de muerte cardiovascular, recurrencia de infarto y trombosis del stent.<sup>67</sup> La resistencia al clopidogrel determinada mediante agregometría plaquetaria, incrementa el riesgo de muerte combinada (OR de 2.9 (95% IC 1.34-3.25)) y de muerte (OR 2.53 (95% IC 0.93-6.88)), de recurrencia de infarto (OR 2.19 (95% IC 1.29–3.72)), de trombosis del stent (OR 1.59 (95% IC 0.53-4.77)) y de EVC (OR 1.17 (95% IC 0.39-3.49)). En el mismo trabajo se obtuvieron resultados similares con el VerifyNow P2Y12 y el Plateletworks . La resistencia al clopidogrel tiene menor valor predictivo para trombosis de la prótesis endocoronaria.<sup>45,51</sup> Otros estudios han encontrado que los polimorfismos del metabolizador pobre (CYP2C19 \*2/\*2) tiene un bajo poder predictivo de recurrencia de efectos adversos.<sup>68</sup>

Por otra parte, el concepto de resistencia a los antiagregantes plaquetarios ha evolucionado con diferentes significados. Desde el punto de vista clínico se refiere a la recurrencia de eventos cardiovasculares a pesar del tratamiento antiagregante, pero el que más ha llamado la atención es el concepto de laboratorio. La reactividad

plaquetaria residual incrementada que se ha encontrado en enfermos durante el tratamiento con clopidogrel, a lo que se ha llamado *resistencia*, es un fenómeno complejo en el que se encuentran involucrados numerosos factores intrínsecos y extrínsecos a las plaquetas. Existe una amplia variación en la prevalencia reportada en los estudios, de acuerdo a los métodos de laboratorio con que se ha evaluado la función plaquetaria. Se han empleado el tiempo de hemorragia,<sup>69</sup> la agregometría plaquetaria,<sup>70</sup> la citometría de flujo,<sup>71</sup> la fosforilación VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein),<sup>72</sup> la excreción urinaria del 11-dehidro-TXB2<sup>72</sup> y diversos dispositivos de pruebas rápidas como el VerifyNow P2Y12,<sup>73</sup> el Plateletworks<sup>73</sup> y el PFA 100.<sup>74</sup> No está claro cuál es mejor método de laboratorio para evaluar la respuesta al clopidogrel y la importancia que tendría conocer este dato para predecir la evolución clínica.

También han variado las definiciones de hiperreactividad plaquetaria y existe incertidumbre sobre el grado de inhibición que se busca con los antiagregantes plaquetarios para lograr una evolución clínica favorable.<sup>75</sup> Existen numerosas causas de hiperreactividad plaquetaria: la aterosclerosis y el infarto agudo del miocardio se encuentran entre las primeras entidades que se asociaron con un incremento en la agregación y adhesión plaquetaria.<sup>76,77,78</sup>

El clopidogrel ha revolucionado el tratamiento antiplaquetario de la enfermedad arterial coronaria en los últimos 10 años. El estudio CAPRIE comparó la eficacia y seguridad de 75 mg de clopidogrel contra 325 mg de aspirina en 19,185 pacientes con evento isquémico cerebral reciente, infarto agudo del miocardio reciente y enfermedad arterial periférica. Se demostró una reducción del riesgo relativo de 8.7% en la tasa de eventos acumulados.<sup>37</sup> El estudio CURE evaluó la eficacia y seguridad temprana y a largo plazo de una dosis de carga de 300 mg de clopidogrel seguidos de 75 mg diarios como mantenimiento contra placebo y tratamiento estándar de 12,562 pacientes con un síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST. El tratamiento se inició en las primeras 24 horas y se demostró una reducción del riesgo relativo de eventos acumulados (infarto agudo del miocardio, evento vascular cerebral o muerte cardiovascular) de 20% a los 12 meses. En el grupo de PCI CURE la reducción del

riesgo relativo fue del 31%.<sup>37</sup> El estudio CREDO determinó el beneficio de una carga de clopidogrel antes de una intervención coronaria percutánea urgente o electiva entre 2,116 pacientes. Se demostró una eficacia a los 12 meses con una reducción significativa del 27% en el riesgo relativo de infarto agudo del miocardio, evento vascular cerebral o muerte.<sup>37</sup> El estudio CLARITY determinó la eficacia del clopidogrel administrado en combinación con aspirina, heparina y terapia fibrinolítica en 3,491 pacientes con infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST. La reducción del riesgo relativo de eventos vasculares fue del 20% en los primeros 30 días.<sup>37</sup> La combinación de una tienopiridina y aspirina ha sido el tratamiento de elección para prevenir la oclusión de prótesis endocoronarias y la recurrencia de eventos cardiovasculares.<sup>79,80,81,82</sup>

Se ha postulado que la resistencia al clopidogrel se debe al hecho de que es una prodroga y que los individuos con una baja capacidad de convertir el clopidogrel al metabolito activo tienen una concentración plasmática baja que no logra inhibir el receptor P2Y<sub>12</sub>,<sup>45,83,84,85</sup> pero los polimorfismos relacionados con el pobre metabolismo tienen baja prevalencia y no explican todos los casos de resistencia. Otra causa de resistencia son los polimorfismos del receptor P2Y<sub>12</sub>, que condicionan menor afinidad por el clopidogrel.<sup>86,87</sup> Además, existen factores intra y extraplaquetarios que producen hiperreactividad que no logra ser inhibida por el clopidogrel o la aspirina. Algunos trabajos sugieren que la leucocitosis<sup>88</sup> y la inflamación podría ser un factor de resistencia al clopidogrel.<sup>89,90,91</sup>

Recientemente han aparecido otros antiagregantes plaquetarios que producen una inhibición plaquetaria más intensa y más rápida, como el prasugrel y el ticagrelor, aunque los primeros datos muestran mayores complicaciones hemorrágicas. En el estudio TRITON se demostró que el prasugrel es particularmente útil en los pacientes con diabetes mellitus y otros factores de recurrencia de eventos cardiovasculares.<sup>92</sup> Los estudios ACAPULCO<sup>93</sup> y JUMBO<sup>94</sup>, han demostrado que el prasugrel produce una mayor inhibición plaquetaria.

La importancia de identificar a los enfermos de alto riesgo de recurrencia, por ejemplo individuos con diabetes mellitus, enfermedad coronaria extensa, múltiples prótesis endocoronarias, trombosis de la endoprótesis e individuos hipometabolizadores de clopidogrel, radica en que podrían ser candidatos a recibir antiplaquetarios con mayor efecto antiagregante.<sup>95</sup>

La determinación de los polimorfismos de CYP2C19 podría ser una herramienta adicional para identificar a los enfermos de alto riesgo de eventos vasculares adversos y buscar otras opciones de tratamiento. El papel del clopidogrel seguirá siendo determinante en el tratamiento de la cardiopatía isquémica, en especial en los pacientes sin otros factores que interfieran con la adecuada respuesta. Recientemente han aparecido guías que han sugerido la conducta que los clínicos podrían tomar frente a las variaciones individuales en la respuesta al tratamiento.<sup>95</sup> Dada la evidencia sustancial de los trabajos publicados y la aparición de antiagregantes plaquetarios más potentes, la genotipificación del CYP2C19 podría ser de utilidad para seleccionar el tratamiento antiagregante en algunos casos.

# LIMITACIONES

---

Nuestra muestra es pequeña lo que dificulta la generalización de los resultados La correlación solo se hizo entre los que tenían los dos pruebas.

# RETOS

---

Es importante el conocer la prevalencia de los polimorfismo presentes en nuestra población en una muestra mayor y de igual manera correlacionar con estudios de agregación plaquetaria, para en un seguimiento clínico, verificar cuál de las dos pruebas podría tener una implicación pronóstica, debido a la gran prevalencia de uso de este fármaco en nuestra población.



# CONCLUSIONES

---

En conclusión, no se ha encontrado cual es el nivel de antiagregación medida en el laboratorio que pueda predecir la evolución clínica favorable e identificar a los pacientes con mayor riesgo de recurrencia. Ser portador de un alelo de pérdida de función del CYP2C19 cuando se usa clopidogrel da lugar a reducción del efecto antiagregante plaquetario y mayor riesgo de episodios aterotrombóticos en comparación con los pacientes que no lo son.

La individualización del tratamiento antiagregante plaquetario parece una estrategia prometedora para los pacientes con cardiopatía isquémica, basándose en factores como el estado de portador de CYP2C19, el uso de clopidogrel en pacientes de bajo riesgo y el empleo de prasugrel o ticagrelor en los pacientes de alto riesgo. La prescripción de prasugrel o ticagrelor a pacientes de alto riesgo podría reducir sus tasas de eventos sin situar a los pacientes de bajo riesgo en una situación de mayor probabilidad de hemorragias. Sin embargo, hay urgente necesidad de test clínicos aleatorizados y amplios en los que se evalúe el tratamiento antiagregante plaquetario individualizado para confirmar esta hipótesis.

Nuestros datos indican que la mayor parte de la población tiene polimorfismos del CYP2C19 que permitirían una adecuada respuesta al clopidogrel. Es probable que en el futuro se requiera una vigilancia de la respuesta antiplaquetaria mediante alguna de las pruebas de función plaquetaria que se han propuesto. La combinación de la farmacogenética con las pruebas de función plaquetaria podría identificar grupos de pacientes de alto riesgo en los que se pueda emplear antiagregantes más potentes.

# BIBLIOGRAFIA.

---

- <sup>1</sup> Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv Pathol Anat.* 1985;90:261-332.
- <sup>2</sup> Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF. The plateletproteome. *Curr Opin Hematol.* 2009;16:329-33.
- <sup>3</sup> Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2317-26.
- <sup>4</sup> Angiolillo DJ, Ferreiro JL. Inhibición del receptor plaquetario P2Y<sub>12</sub> de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63:60-76.
- <sup>5</sup> Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Berndt MC. Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life.* 2004;56:13-8.
- <sup>6</sup> Siljander PR, Munnix IC, Smethurst PA, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand WH, et-al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood.* 2004;103:1333-41.
- <sup>7</sup> Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:3378-84.
- <sup>8</sup> Chen C, Chai H, Wang X, Jiang J, Jamaluddin MS, Liao D, et-al. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood.* 2008;112:3205-16.
- <sup>9</sup> Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, et-al. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem.* 1996;271:27723-9.
- <sup>10</sup> Tselepis AD, Gerotziapas G, Andrikopoulos G, Anninos H, Vardas P. Mechanisms of platelet activation and modification of response to antiplatelet agents. *Hellenic J Cardiol.* 2011;52:128-40.
- <sup>11</sup> Léon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, et-al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y<sub>1</sub>(1) receptor null mice. *J Clin Invest.* 1999;104:1731-7.
- <sup>12</sup> Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A<sub>2</sub>-induced platelet aggregation Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem.* 1999;274:29108-14.
- <sup>13</sup> Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outsidein, and sideways. *Thromb Haemost.* 1999;82:318-25.
- <sup>14</sup> Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J.* 2010;31:17-28.
- <sup>15</sup> Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates F aggregation. *Proc Natl Acad Sci F USA.* 1990;87:5193-7

- 
- <sup>16</sup> Bergandi L, Cordero M, Anselmino M, Ferraro G, Ravera L, Dalmaso P, et-al. Altered nitric oxide/cGMP platelet signaling pathway in platelets from patients with acute coronary syndromes. *Clin Res Cardiol*. 2010;99:557-64.
- <sup>17</sup> López-Farré A, Riesco A, Digiuni E, Mosquera JR, Caramelo C, De Miguel LS, et-al. Aspirin-stimulated nitric oxide production by neutrophils after acute myocardial ischemia in rabbits. *Circulation*. 1996;94:83-7.
- <sup>18</sup> Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001;88:756-62.
- <sup>19</sup> Beghetti M, Sparling C, Cox PN, Stephens D, Adatia I. Inhaled NO inhibits platelet aggregation and elevates plasma but not intraplatelet cGMP in healthy human volunteers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H637-42
- <sup>20</sup> López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M, et-al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation*. 1995;91:2080-8.
- <sup>21</sup> Grosser N, Schröder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the nitric oxide-cGMP pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1345-51.
- <sup>22</sup> Aszódi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, et-al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J*. 1999;18:37-48.
- <sup>23</sup> Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M, Gambaryan S, Krenn V, Geiger J, et-al. Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:8120-5.
- <sup>24</sup> Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davì G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev*. 2012;13:27-42.
- <sup>25</sup> Rajendran S, Chirkov YY. Platelet hyperaggregability: impaired responsiveness to nitric oxide ("platelet NO resistance") as a therapeutic target. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2008;22:193-203.
- <sup>26</sup> Vizioli L, Muscari S, Muscari A. The relationship of mean platelet volume with the risk and prognosis of cardiovascular diseases. *Int J Clin Pract*. 2009;63:1509-15.
- <sup>27</sup> Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CP, Hillman RS. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol*. 1992;98:637-46.
- <sup>28</sup> Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999;30:111-42.
- <sup>29</sup> Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of cox-2 inhibition: Therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest*. 2006;116:4-15.
- <sup>30</sup> Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86.
- <sup>31</sup> Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, et-al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with st-elevation myocardial infarction: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1999 guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction). *Circulation*. 2004;110:e82-e292.

- 
- <sup>32</sup> Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation*. 2002;105:1650-5.
- <sup>33</sup> Storey RF. Biology and pharmacology of the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor. *Curr Pharm Des*. 2006;12:1255-9.
- <sup>34</sup> Savi P, Herbert JM. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y<sub>12</sub> adenosine diphosphatereceptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:174-83.
- <sup>35</sup> Xiao ZTP. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1982-8.
- <sup>36</sup> Quinn MJ, Zidar F, Vivekananthan D, Chew DP, Ellis SG, Plow E, et-al. Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2004;93:679-84.
- <sup>37</sup> A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events, (CAPRIE)., CAPRIE., Steering, Committee. *Lancet*. 1996;348:1329-39.
- <sup>38</sup> Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: A review of the evidence. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1157-64.
- <sup>39</sup> Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance?. *Thromb Res*. 2007;120:311-21.
- <sup>40</sup> Simon T, Bhatt DL, Bergougnan L, et al. Genetic Polymorphisms and the Impact of a Higher Clopidogrel Dose Regimen on Active metabolite exposure and Antiplatelet Response in Healthy Subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2011; 90(2): 287-295.
- <sup>41</sup> Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, 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;38:92–99.
- <sup>42</sup> Tuffal G, Roy S, Lavisse M, et al. An improved method for specific and quantitative determination of the clopidogrel active metabolite isomers in human plasma. *Thromb. Haemost.* 2011;105:696–705.
- <sup>43</sup> Fontana P, Dupont A, Gandrille S, *et al.* Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y<sub>12</sub> gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003;108: 989–995.
- <sup>44</sup> Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*. 2003;107:2908-13.
- <sup>45</sup> 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;303:754-62
- <sup>46</sup> Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et-al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:919-33.
- <sup>47</sup> 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;302:849-57

- 
- <sup>48</sup> Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, Weerakkody G, Farid NA, Small DS, et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J*. 2007;153:66.e9–16.
- <sup>49</sup> Holmes DR, Dehmer GJ, Kaul S, Leifer D, O’Gara PT, Stein CM. ACCF/AHA clopidogrel clinical alert: approaches to the FDA “boxed warning”: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the American Heart Association. *Circulation*. 2010;122:537-57.
- <sup>50</sup> 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;304:1821-30.
- <sup>51</sup> 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;363:1704-14.
- <sup>52</sup> Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, et-al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet*. 2010;376:1320-8.
- <sup>53</sup> 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;65:219-26.
- <sup>54</sup> 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;160:506-12
- <sup>55</sup> 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;305:1097-105.
- <sup>56</sup> Douglas J, Thrity A, Leonthena R, et al. Platelet Function Testing by aggregometry; approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. H58-A 2008; 28(31).
- <sup>57</sup> Azarpira N, Namazi S, Hendijani F, et al. Investigation of allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 in Iran. *Pharmacological Reports* 2010; 62: 740-746.
- <sup>58</sup> Scordo MG, Caputi AP, D’Arrigo C, et al. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res* 2004; 50: 195-200.
- <sup>59</sup> Isaza C, Henao J, Martínez JH, et al. Phenotype-genotype analysis of CYP2C19 in Colombian mestizo individuals. *BMC Clin Pharmacol* 2007; 7,6.
- <sup>60</sup> Lamba JK, Dhiman RK, Kohli KK, et al. CYP2C19 genetic mutations in North Indians. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68: 328-335.
- <sup>61</sup> Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59:303-312.
- <sup>62</sup> Harker LA. Platelet survival time. It’s measurement and use. *Prog Hemost Throm* 1978; 4:321.

- 
- <sup>63</sup> Penington DG, Lee NLY, Roxburgh AE, et al. Platelet density and size: The interpretation of heterogeneity. *Br J Haematol* 1967; 34:365.
- <sup>64</sup> Karpatkin S, Khan O, Freedman M. Heterogeneity of platelet function. Correlation with platelet volume. *Am J Med* 1978; 64: 542.
- <sup>65</sup> Yasar AS, Erbay AR, Ayaz S, et al. Increased platelet activity in patients with isolated coronary artery ectasia. *Coron Artery Dis* 2007; 18(6):451-454
- <sup>66</sup> Wiviott SD, Antman EM. Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story. *Circulation* 2004;109:3064 –7.
- <sup>67</sup> Aradi D, Komócsi A, Vorobcsuk A, et al. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: Systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2010; 160: 543-51
- <sup>68</sup> Siller-Matula JM, Delle-Karth G, Lang IM, et al. Phenotyping Versus Genotyping for Prediction of Clopidogrel Efficacy and Safety: the PEGASUS-PCI Study. *J Thromb Haemost*. 2012 Jan 19. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04639.x. [Epub ahead of print]
- <sup>69</sup> Izaguirre R, De la Peña-Díaz A, Barinagarrementería F, González H, Ramírez AE. Effect of Clopidogrel on Platelet Aggregation and Plasma Concentration of Fibrinogen in Subjects with Cerebral or Coronary Atherosclerotic Disease. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2002 8:169-177.
- <sup>70</sup> Wiviott SD, Trenk D, Frelinger AL, et al. Prasugrel compared with high loading and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: the prasugrel in comparison to clopidogrel for inhibition of platelet activation and aggregation thrombolysis in myocardial infarction 44 trial. *Circulation* 2007, 116:2923-2923.
- <sup>71</sup> Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. High post –treatment platelet reactivity identified los-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost*, 2005 4:542-549.
- <sup>72</sup> Geiger , Teichmann L, Grossmann R, et al. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clinical Chemistry* 2005; 51(6):957-965.
- <sup>73</sup> Michelson AD, Frelinger AL, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006, 98(suppl):4N-10N.
- <sup>74</sup> Lepantalo A, Vitanen KS, Heillila J, et al. Limited early antiplatelet effect of 300mg clopidogrel in patients with aspirin therapy undergoing percutaneous coronary interventions. *European Heart Journal* 2004, 25:476-483.
- <sup>75</sup> Bhatt D. Intensifying platelet inhibition – Navigating between Scylla and Charybdis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2078-2081.
- <sup>76</sup> Moolten S, Vroman L, Vroman G, et al. Adhesiveness of blood platelets in thromboembolism and hemorrhagic disorders. *Am J Clin Path* 1949; 19:814-826.
- <sup>77</sup> Mc Donald I, Edgill M. Coagulability of the blood in ischaemic heart disease. *Lancet* 1957; II:457-460.
- <sup>78</sup> Murphy B, Mustad J. Coagulation test and platelet economy in atherosclerosis and control subjects. *Circulation* 1962; 25:114-125.

- 
- <sup>79</sup> Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, 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; 358:527-533.
- <sup>80</sup> Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary interventions – a randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:2411-2420.
- <sup>81</sup> Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2011;345:494-502.
- <sup>82</sup> The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without ST-segment elevation of European Society of Cardiology. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without ST-segment elevation. *European Heart Journal* 2011; 32:2999-3054.
- <sup>83</sup> Kellan E, Lincoff A, Lincoff M. Pharmacologic inhibition of platelet Function. Correlation between *in vitro* test of platelet function and clinical outcomes. *Am J. Cardiovasc Drugs* 2008; 8 (5): 283-295.
- <sup>84</sup> Michowitz Y, Blatt A, Frimmerman A, et al. Stent thrombosis in patients treated with thienopyridines: clinical description of 10 cases. *International Journal of Cardiovascular Interventions* 2004; 3(4):160-164.
- <sup>85</sup> Rajendran S, Parikh D, Shugman I, et al. High on Treatment Platelet Reactivity and stent Thrombosis. *Hearth, Lung and Circulation* 2011; 20:525-531.
- <sup>86</sup> Shanker J, Gasparyan AY, Kitas GD, et al. Platelet function and antiplatelet therapy in cardiovascular disease: implications of genetic polymorphisms. *Curr Vasc Pharmacol* 2011; 9(4):479-489.
- <sup>87</sup> Bonello L, Bonello-Palot N, Armero S, et al. Impact of P2Y12-ADP receptor polymorphism on the efficacy of clopidogrel dose-adjustment according to platelet reactivity monitoring in coronary artery disease patients. *Thromb Res* 2010; 125(4):e167-70.
- <sup>88</sup> Osmancik P, Paulu P, Tousek P, et al. High leukocyte count and interleukin-10 predict high on-treatment-platelet-reactivity in patients treated with clopidogrel. *J Thromb Thrombolysis* 2011; [Epub ahead of print]
- <sup>89</sup> Acikel S, Akdemir R. The relationship between inflammation, platelet activation and antiplatelet resistance. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010; 9(5):364-381.
- <sup>90</sup> Saw J, Madsen EH, Chan S, et al. The ELAPSE (Evaluation of Long-Term Clopidogrel Antiplatelet and Systemic Anti-Inflammatory Effects) study. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52(23):1826-1833.
- <sup>91</sup> Ge H, Zhou Y, Liu X, et al. Relationship between plasma inflammatory markers and platelet aggregation in patients with clopidogrel resistance after angioplasty. *Angiology* 2012; 63(1):62-66.
- <sup>92</sup> Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Intensive oral antiplatelet therapy for reduction of ischaemic events including stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with percutaneous coronary intervention and stenting in the TRITON TIMI 38 trial: a sub-analysis of a randomized trial. *Lancet* 2008;371:1353-1363.
- <sup>93</sup> Montalescot G, Sideris G, Cohen R, et al. Prasugrel compared with high-dose clopidogrel in acute coronary syndrome. The randomized, double-blind ACAPULCO study. *Thromb Haemost* 2012; 103: 213-223.

---

<sup>94</sup> Serebruany V, Midei M, Meilman H, et al. Platelet inhibition with prasugrel (CS-747) compared with clopidogrel in patients undergoing coronary stenting: the subset from the JUMBO study. *Postgrad Med J* 2006; 82:404-410.

<sup>95</sup> Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) Genotype and Clopidogrel Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 90(2): 328–332.