



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO FARMACOGENÓMICO DE RESISTENCIA AL CLOPIDOGREL

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
BEATRIZ CALDERÓN CRUZ

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. AURORA DE LA PEÑA DÍAZ  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ TUTOR  
DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN  
FACULTAD DE MEDICINA  
DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. FEBRERO DE 2016



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres María de los Ángeles Cruz Siete y Heriberto Calderón Herrera, quienes me han dado el ejemplo y el apoyo para salir adelante siempre, por haberme inculcado valores y educación, por ser comprensivos y honestos, porque son ellos mi mayor motivo e impulso para superarme. Porque los quiero más que a nada en este mundo y los admiro de sobremanera, les dedico ésta tesis y mi título también.

A mis hermanas Gaby y Jannet, porque son también mis amigas y mis cómplices, por todos los consejos, la compañía, las risas y los llantos que durante 30 años hemos compartido aún en la distancia.

A mis sobrinos que tanto adoro, Kevin, Gaby y Arturo. Por la alegría, la inocencia y las enseñanzas que me han brindado, porque trato siempre de ser el mejor ejemplo para ellos.

A la abuela (Leonor) que tanto quiero, que siempre ha estado a nuestro lado, que me ha cuidado, me ha escuchado y me ha acompañado, por su incondicionalidad infinita.

Por supuesto a la Dra. Aurora De la Peña, por su paciencia, su apoyo, su confianza, su constancia y sus enseñanzas, no solo académicas... ¡Dra. Lo logramos!

A mis amigos, que no quiero mencionar de manera individual porque no me gustaría omitir ningún nombre, pero a ellos que han estado siempre para animarme y alegrarme, y que me han acompañado a lo largo de la vida y de la tesis (también cuando la tesis se convierte en tu vida).

A todos los investigadores que me han dejado alguna enseñanza, a los que me han aportado críticas constructivas y no tan constructivas. Principalmente a aquellos por los que he desarrollado admiración y a quienes les voy siguiendo los pasos. A aquellos que son mi inspiración, en la ciencia, en la investigación y por supuesto en el resto de la vida.

A los que sigo considerando como “mis niños”, mis alumnetos, gracias por todo su apoyo sin ustedes no habría sido posible todo esto. Quiero agradecer especialmente a los niños (aunque ya no son tan niños) más involucrados en el proyecto con quienes compartí risas, frustraciones, enojos, logros y por supuesto enseñanzas, los menciono sin ningún orden en particular: Karen, Antonio, Luis, Aketzali, Chava, Diana y Astrid. Gracias por su compañerismo, su amistad, su confianza, su dedicación y su tiempo, son y serán siempre un orgullo para mí.

Desde luego un agradecimiento a todas las instituciones que apoyaron de alguna manera la realización y difusión de éste proyecto, la UNAM, el Instituto Nacional de Cardiología, CONACYT, la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, la International Society of Thrombosis and Haemostasis y cualquier otra instituciones que se me pase mencionar por aquí.

Y como dirían por ahí *last but not least* a esas personas que conservan un lugarcito en mi hipotálamo, gracias por la dopamina, la compañía, las experiencias y las enseñanzas, siempre para crecer, mejorar y madurar.

## ABREVIACIONES

ADP = Adenosin difosfato

AMPc = Adenosin monofosfato cíclico

Ca<sup>2+</sup> = Calcio

CURE = Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events

DNA = Ácido Desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético

EXCELSIOR = Impact of extent of clopidogrel induced platelet inhibition during elective stent implantation on clinical event rate

FDA = Food and Drug Administration

Gp-P = Glicoproteína P

GP IIb/IIIa = Glicoproteína IIb/IIIa

ICP = Intervención coronaria percutánea

INC = Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

INEGI = Instituto Nacional de Estadística y Geografía

PAHs = Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

PPP= Plasma pobre en plaquetas

PRP= Plasma rico en plaquetas

PON-1 = Paraoxonasa-1

r.p.m = Revoluciones por minuto

RENASICA = Registro Nacional de Síndromes Coronarios Isquémicos en México

SICA = Síndrome Isquémico Coronario Agudo

UNAM = Universidad Nacional Autónoma de México

# Contenido

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 7  |
| ABSTRACT .....                                       | 8  |
| I. MARCO TEÓRICO.....                                | 9  |
| 1.1 TROMBOSIS CORONARIA.....                         | 9  |
| 1.2 ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS .....                | 10 |
| 1.3 BAJA RESPUESTA AL CLOPIDOGREL .....              | 14 |
| 1.4 MECANISMOS DE BAJA RESPUESTA AL CLOPIDOGREL..... | 16 |
| 1.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS .....                    | 19 |
| II. JUSTIFICACIÓN .....                              | 20 |
| III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....                 | 21 |
| IV. HIPÓTESIS.....                                   | 21 |
| V. OBJETIVOS.....                                    | 22 |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL .....                           | 22 |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                       | 22 |
| VI. DISEÑO DEL ESTUDIO .....                         | 23 |
| VII. TAMAÑO DE MUESTRA .....                         | 23 |
| VIII. METODOLOGÍA .....                              | 24 |
| 8.1 MATERIALES Y REACTIVOS .....                     | 24 |
| 8.2 DESCRIPCION OPERATIVA .....                      | 25 |
| 8.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....                      | 26 |
| 8.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....                      | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 8.5 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....                      | 26 |
| 8.6 EXTRACCIÓN DE LA INFORMACIÓN CLÍNICA .....          | 26 |
| 8.7 MUESTRA DE SANGRE .....                             | 27 |
| 8.7.1 AGREGACIÓN PLAQUETARIA POR EL MÉTODO ÓPTICO ..... | 27 |
| 8.8 EXTRACCIÓN DE DNA.....                              | 29 |
| 8.9 PCR EN TIEMPO REAL .....                            | 29 |
| 8.9.1 SITIOS POLIMÓRFICOS ANALIZADOS .....              | 30 |
| 8.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....                          | 33 |
| 8.11 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....                        | 34 |
| IX. RESULTADOS.....                                     | 34 |
| 9.1 AGREGACIÓN PLAQUETARIA .....                        | 34 |
| 9.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS .....                       | 37 |
| 9.3 MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA.....                  | 40 |
| X. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....                       | 41 |
| XI. ANEXOS .....  | 46 |
| ANEXO I .....   | 46 |
| ANEXO II.....   | 47 |
| XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                    | 48 |



## RESUMEN

El clopidogrel es un profármaco y su absorción intestinal está limitada por la glicoproteína P (Gp-P), la cual es codificada por el gen ABCB1. Éste profármaco se metaboliza en el hígado con las enzimas del citocromo P450, las cuales son codificadas por los genes CYP, para producir el metabolito activo que antagoniza el receptor plaquetario P2Y<sub>12</sub>. Algunos pacientes presentan baja respuesta al clopidogrel relacionada con polimorfismos, resultando en el desarrollo de eventos trombóticos. El objetivo de éste estudio fue estimar la frecuencia de baja respuesta al clopidogrel y su relación con la presencia de polimorfismos de los genes ABCB1, CYP2C19, CYP3A5 y P2RY12 en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea (ICP).

Se incluyeron un total de 276 pacientes sometidos a ICP. La baja respuesta al clopidogrel se determinó con agregometría por el método óptico usando 10  $\mu$ M de ADP. Los pacientes que tuvieron una agregación plaquetaria mayor al 70% se clasificaron como pacientes con baja respuesta. Los polimorfismos fueron estudiados con la técnica de PCR en tiempo real.

La frecuencia de baja respuesta al clopidogrel fue del 22.1%. El genotipo TT del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 y la ingesta de omeprazol se asociaron con la baja respuesta al clopidogrel Exp ( $\beta$ ) 2.73,  $p = 0.009$  and Exp ( $\beta$ ) 3.86,  $p = 0.04$ , respectively).

En conclusión la baja respuesta al clopidogrel se asocia con el genotipo TT del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 en población mexicana.

## **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Clopidogrel is a pro-drug and its intestinal absorption is limited by the P-glycoprotein encoded by the ABCB1 gene. It is metabolized hepatically by cytochrome P450 enzymes encoded by CYP genes to produce an active metabolite that antagonizes the P2Y12 platelet receptor. Some patients exhibit poor clopidogrel responsiveness due to polymorphisms, resulting in thrombotic events. The aim of this study was to determine the relationship between poor clopidogrel responsiveness and the ABCB1, CYP and P2RY12 gene polymorphisms among patients undergoing percutaneous coronary intervention (PCI).

**METHODS AND RESULTS:** Two hundred seventy-six patients who underwent PCI were included in this study. Clopidogrel responsiveness was determined via optical aggregometry in platelet-rich plasma using 10  $\mu$ M ADP. Patients exhibiting a platelet aggregation response higher than 70% were classified as poor responders. The genetic polymorphisms were analyzed via real-time PCR.

Poor responsiveness to clopidogrel was noted in 22.1% of the patients. The TT genotype of the C3435T polymorphism of the ABCB1 gene and omeprazole usage were each associated with poor clopidogrel responsiveness (Exp ( $\beta$ ) 2.73,  $p = 0.009$  and Exp ( $\beta$ ) 3.86,  $p = 0.04$ , respectively).

**CONCLUSION:** Poor clopidogrel responsiveness is associated with the TT genotype of the C3435T polymorphism of the ABCB1 gene.

## **I. MARCO TEÓRICO**

### **1.1 TROMBOSIS CORONARIA**

De acuerdo a la información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en México las enfermedades del corazón (principalmente las enfermedades isquémicas) ocupan el primer lugar como causa de muerte en la población general<sup>1</sup>.

El Registro Nacional de Síndromes Coronarios Isquémicos II en México (RENASICA II) reportó que las características clínicas de los pacientes mexicanos con síndrome coronario isquémico agudo (SICA) son 43% diabéticos, 50% hipertensos y una tercera parte de sexo femenino. De acuerdo a las estadísticas del Departamento de Urgencias y Unidad Coronaria del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC) aproximadamente ingresan anualmente 1,400 pacientes con diagnóstico de SICA de un total aproximado de 140,000 consultas, 35% de diabéticos, 50% con antecedentes de hipertensión arterial, 20% son mujeres y un alto porcentaje de tabaquismo y dislipidemia<sup>2</sup>.

Las plaquetas tienen un papel fundamental en el desarrollo de los SICA después de la ruptura de la placa de ateroma. Durante el proceso de la aterosclerosis se forma un depósito gradual y crónico de colesterol y otros componentes de la placa que súbitamente puede perder estabilidad y romperse. La ruptura de la placa de ateroma genera un sitio de lesión en donde se inicia el proceso hemostático que

no siempre es regulado apropiadamente y puede bloquear la luz de un vaso sanguíneo<sup>3:4</sup>. Cuando existe una lesión en los vasos sanguíneos, las plaquetas rápidamente se adhieren al sitio y se agregan para formar un parche hemostático que se estabiliza con la presencia de fibrina; para tal acción, es necesario que intervengan proteínas adhesivas que reconocen a receptores específicos (glicoproteínas) presentes en la membrana de las plaquetas<sup>3</sup>.

En general en el proceso hemostático se reconocen dos fases: la adhesión y la agregación. En la primera fase las plaquetas interactúan con el endotelio vascular a través de proteínas de superficie. En la fase de agregación, la glicoproteína IIb/IIIa es activada por diferentes vías con diversos agonistas entre los que destacan el tromboxano A<sub>2</sub> y el ADP. Posteriormente, el fibrinógeno se une a la glicoproteína IIb/IIIa atrayendo nuevas plaquetas activadas y magnificando el proceso que concluye en la consolidación y la formación de un coágulo sobre el cual se deposita el polímero de la fibrina. La regulación de la hemostasia, tanto por los mecanismos fisiológicos pro y anticoagulantes permiten el equilibrio del sistema, lo que asegura que las fases en las cuales se divide para su estudio, guarden una adecuada función fisiológica<sup>3:4</sup>.

## **1.2 ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS**

La principal estrategia en el tratamiento y prevención de los SICA, es el uso de antiagregantes plaquetarios<sup>5</sup>.

Los fármacos antiagregantes plaquetarios más usados en la actualidad pertenecen a alguno de los siguientes grupos<sup>6</sup>:

1. Inhibidores de la enzima cicloxigenasa-1 (COX-1)
2. Antagonistas del receptor de adenosindifosfato (ADP)
3. Antagonistas del receptor GPIIb/IIIa
4. Inhibidores de la síntesis de tromboxano A2

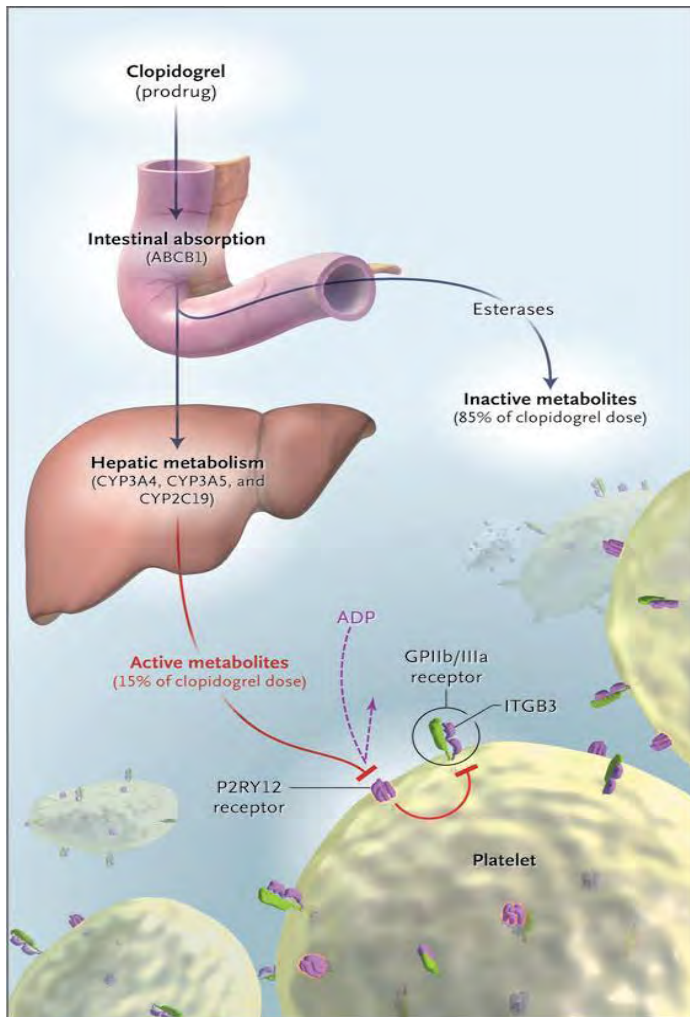
Tanto en la prevención como en el tratamiento de las enfermedades aterotrombóticas, la aspirina es el medicamento de elección por su perfil costo-efectividad, sin embargo la protección que ofrece es relativamente moderada. La búsqueda de nuevos fármacos con actividad antiagregante plaquetaria, introdujo nuevos compuestos entre los que destacan las tienopiridinas, principalmente el clopidogrel y el prasugrel. Las tienopiridinas proporcionan una inhibición de la agregación plaquetaria más potente que la aspirina, en los pacientes con síndromes coronarios agudos<sup>6</sup>.

El tratamiento de elección para los SICA, en especial en los pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea, es la terapia dual de aspirina y una tienopiridina<sup>7;8;9</sup>. En México, el costo de los medicamentos es un importante factor que puede determinar el tratamiento farmacológico otorgado. El elevado costo del prasugrel es uno de los factores que contribuye al frecuente uso del clopidogrel en pacientes mexicanos. La terapia dual de aspirina (100-325 mg/día) y clopidogrel

(75 mg/día) alcanza un efecto antiagregante plaquetario satisfactorio sin incrementar los efectos adversos, en la mayoría de los casos, principalmente la hemorragia 8.

La eficacia de la terapia dual aspirina plus clopidogrel para el tratamiento de las enfermedades aterotrombóticas, se debe a que disminuye la actividad de las plaquetas por dos mecanismos independientes. El ácido acetilsalicílico (aspirina) inhibe a la enzima ciclooxigenasa, previniendo de esta manera la formación de tromboxano A2 y por consiguiente la agregación plaquetaria<sup>8;10</sup>. Por otro lado, el clopidogrel es un pro-fármaco que se absorbe en el intestino y se metaboliza en el hígado a través de isoenzimas específicas del citocromo P450 para generar el metabolito activo que bloquea la actividad del ADP al inhibir el receptor P2Y<sub>12</sub><sup>11;12</sup>, figura 1.

FIG 1. METABOLISMO DEL CLOPIDOGREL



La absorción intestinal del clopidogrel depende de la actividad de la glicoproteína-P codificada por el gen ABCB1. La mayor parte del profármaco se metaboliza por esterasas en componentes inactivos (principalmente clopidogrel ácido carboxílico). La parte restante del profármaco, se metaboliza en el hígado por el citocromo p450, para generar el metabolito activo 2-((3Z)-1-((1S)-1-(2-clorofenil)-2-metoxi-2-oxoetil)-4-sulfanilpiperidin-3-iliden) ácido acético, el cual antagoniza irreversiblemente el receptor P2Y12 del ADP (codificado por el gen P2RY12), inhibiendo de esta manera la agregación plaquetaria.

(Imagen tomada de Simon T, et al. *N Engl J Med* 2009; 360: 363-75)

Algunos pacientes, en tratamiento dual de aspirina y clopidogrel, muestran una protección insatisfactoria contra los SICA, ya que tienen mecanismos procoagulantes que no pueden atenuarse apropiadamente. Estos pacientes mantienen una actividad plaquetaria elevada pese a estar bajo tratamiento antiagregante<sup>8</sup>.

De acuerdo a datos del estudio EXCELSIOR (por sus siglas en inglés Impact of extent of clopidogrel induced platelet inhibition during elective stent implantation on clinical event rate), el 40% de los pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea (ICP) tienen variabilidad en sus agregaciones plaquetarias mayores a 14% después de la administración de 600 mg de clopidogrel<sup>13</sup>.

Hasta la fecha no existe un tratamiento óptimo, todos cursan con efectos adversos y en el peor de los casos la baja respuesta a los fármacos antiagregantes plaquetarios conlleva a la aparición de eventos trombóticos recurrentes, tales como la trombosis del stent, reestenosis, infarto al miocardio y eventos cerebrovasculares que ponen en riesgo la vida de los enfermos<sup>14</sup>.

### ***1.3 BAJA RESPUESTA AL CLOPIDOGREL***

La baja respuesta al clopidogrel, se define como “una insuficiente respuesta inhibitoria de la agregación plaquetaria (hiperactividad plaquetaria) después de la administración del medicamento”<sup>15</sup>.

Para identificar la baja respuesta funcional al clopidogrel, la técnica de agregación plaquetaria por el método óptico se considera “el estándar de oro”. Esta técnica mide la respuesta antiagregante plaquetaria del fármaco con el porcentaje de agregación de las plaquetas. Para determinar la respuesta antiagregante del clopidogrel se utiliza como agente agonista el adenosindifosfato (ADP)<sup>16</sup>. El efecto máximo del clopidogrel es detectable hasta 24 horas después de la administración



de una dosis de carga de 300 o 600 mg<sup>17</sup>. No existe consenso sobre el valor umbral en el porcentaje de agregación para identificar a los pacientes con baja respuesta al clopidogrel, la amplia variabilidad se debe a diferencias metodológicas y de diseño experimental<sup>18;19</sup>.

La prevalencia de baja respuesta al clopidogrel, medida por agregación plaquetaria con el método óptico, se ha reportado de 5 a 30% en población caucásica<sup>14</sup>. En tanto que la baja respuesta a la terapia dual aspirina más clopidogrel se ha reportado de 1 a 45%<sup>20</sup>. En México existe el antecedente de que el empleo de clopidogrel en el Instituto Nacional de Cardiología disminuye la agregación plaquetaria en un promedio de 40%, sin embargo la publicación no menciona los casos de baja respuesta<sup>12</sup>. En diferentes congresos nacionales la frecuencia de baja respuesta al clopidogrel (determinada por agregación plaquetaria) se ha documentado de 7%<sup>21</sup> y 13%<sup>22</sup>. Lo anterior pone de manifiesto la relevancia de este estudio en pacientes mexicanos que asisten a un instituto de referencia nacional. También existen publicaciones (Isordia-Salas et al.) que identifican una baja respuesta hasta en 80% de la población estudiada. La notable diferencia puede ser el resultado del momento clínico en el que se colecta la muestra. Al inicio del tratamiento los casos de resistencia, que se identifica como una persistencia a la agregación plaquetaria, son menos frecuentes, se van incrementando a medida que el tiempo de administración se incrementa. No se ha dado explicación a este fenómeno ni a la consecuencia clínica del mismo.

#### **1.4 MECANISMOS DE BAJA RESPUESTA AL CLOPIDOGREL**

Los mecanismos que conducen a la baja respuesta al clopidogrel no se han elucidado por completo, por lo que es considerado como un evento multifactorial<sup>10</sup>.

Existen estudios que reportan:

1. interacción farmacológica entre medicamentos Inhibidores de la Bomba de Protones (como el omeprazol) y el clopidogrel. Esta interacción es debida a que el omeprazol utiliza las enzimas hepáticas CYP2C19 y CYP2C9 en su metabolismo, las cuales también son utilizadas por el clopidogrel. De esta manera, se genera una competencia por las mismas enzimas hepáticas que se traduce en la disminución de la cantidad de metabolito activo de clopidogrel y por consiguiente en una baja respuesta<sup>23</sup>.
2. Se ha reportado que los pacientes sometidos a ICP, que mantienen tratamiento con clopidogrel y con edad  $\geq 75$  años presentan hiperactividad plaquetaria más que los pacientes con edad  $< 75$  años<sup>24</sup>. Esta situación puede deberse a la disminución del metabolismo de diferentes sustratos del citocromo P450 en personas de edad avanzada, ya que al ocurrir la disminución de la función hepática disminuiría también la cantidad de metabolito activo de clopidogrel generada<sup>25</sup>.
3. Por otro lado, los pacientes con un índice de masa corporal de  $28.1 \pm 3.26$  kg/m<sup>2</sup> se han asociado frecuentemente con la baja respuesta al clopidogrel. Estos individuos al tener más tejido graso, tienen mayor volumen de

distribución al fármaco, por lo que dosis mayores de clopidogrel para alcanzar un efecto favorable son requeridas<sup>26</sup>.

4. Contrario a lo anterior, un estudio reportó que el clopidogrel tiene un mejor efecto en los pacientes que son fumadores recurrentes (los que fuman al menos un cigarrillo al día), sin embargo, éstos tienen un mayor riesgo de sangrado que los pacientes no fumadores (los que nunca han fumado). Este evento es conocido como “La paradoja de los fumadores”, la cual se caracteriza por una menor frecuencia de eventos trombóticos adversos post-ICP en los fumadores que en los no fumadores. Esta paradoja puede ser debido a que el humo del cigarro induce la activación del CYP1A2, gen involucrado en la metabolización del clopidogrel, este gen codifica para una proteína localizada en el retículo endoplásmico y su expresión es inducida por algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) que se encuentran en el humo del cigarro<sup>27</sup>.
5. Por otro lado, se ha demostrado que la insulina bloquea una proteína  $G_i$  y este bloqueo interfiere con la liberación intracelular de  $Ca^{2+}$ , la supresión de adenosin monofosfato cíclico (cAMP), la inhibición del receptor P2Y12 del ADP y por consiguiente la reducción de la actividad plaquetaria. Se sugiere que la pérdida de la respuesta a la insulina, podría explicar la hiperactividad de las plaquetas en los enfermos diabéticos<sup>28</sup>.

6. Otro de los posibles mecanismos del fenómeno de baja respuesta al clopidogrel, son los polimorfismos tanto de las proteínas de absorción intestinal como del citocromo P450<sup>29;30</sup>.

En poblaciones no mexicanas, principalmente caucásicas y asiáticas, se ha descrito que la baja respuesta al tratamiento con clopidogrel puede ser el resultado de:

- a) Una absorción intestinal disminuida por la presencia del sitio polimórfico C3435T del gen ABCB1. Este gen codifica para la glicoproteína P (Gp-P), la cual limita la absorción intestinal del clopidogrel. La presencia del polimorfismo C3435T incrementa la limitación de la absorción del fármaco<sup>31</sup>.
- b) Presencia de los polimorfismos genéticos de las isoformas enzimáticas del citocromo P450 en particular las variantes alélicas CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3. Algunos estudios han publicado que los portadores de estas variantes alélicas generan menor cantidad de metabolito activo del clopidogrel, lo cual conlleva a la baja respuesta<sup>32;33;34;35</sup>.
- c) Disminución de la actividad biológica del receptor P2Y12 del ADP por la presencia de polimorfismos en el gen P2RY12<sup>36</sup>.

A pesar de la ausencia de estudios en población latinoamericana, se ha publicado que la baja respuesta farmacocinética y farmacodinámica al clopidogrel se presenta en aproximadamente la cuarta o tercera parte de toda la población

general<sup>28</sup>. El perfil genético interviene de manera muy importante para predisponer a los eventos trombóticos<sup>29;37</sup>.

### **1.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

El polimorfismo C3435T del gen ABCB1, tiene una frecuencia en caucásicos, asiáticos y latinos de 25%, 56% y 50% respectivamente<sup>38;39</sup>. Sin embargo, se desconocen estudios que hayan reportado la frecuencia de este polimorfismo en población mexicana.

La frecuencia de aparición de los polimorfismos de los genes que codifican para las enzimas del citocromo P450, varía notablemente entre diferentes grupos étnicos<sup>29</sup>. Los polimorfismos en el gen CYP2C19 se encuentran en aproximadamente 30% de la población caucásica, 40% de la población negra y más del 55% de la población del este asiático<sup>30</sup>. En población caucásica, la frecuencia de la variante alélica CYP2C19\*2 y CYP2C19\*3 es del 15% del 1-6% respectivamente, en asiáticos estas frecuencias aumentan a 24.7% y 13-23% respectivamente<sup>40</sup>, en la población México Americana se han reportado frecuencias de 9.7% y 1% respectivamente<sup>41</sup>. Se desconocen estudios que hayan reportado la frecuencia de estos genotipos en población mexicana.

La información publicada referente a los polimorfismos del gen P2RY12 no es muy diversa. Se ha reportado que el polimorfismo G1233A tiene una frecuencia de 99% en población africana y los polimorfismos G52T y C34T tienen una frecuencia de 1% y 10%, respectivamente, en población caucásica<sup>42</sup>.

En México y Latinoamérica, no existen estudios que hayan determinado la relación de los polimorfismos C3435T del gen ABCB1, CYP2C19\*2, CYP2C19\*3, CYP3A5\*3 y del gen P2RY12 los polimorfismos G1233A, G52T y C34T con la baja respuesta al clopidogrel.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

La baja respuesta a la acción de los agentes antiagregantes plaquetarios, como el clopidogrel, es un problema clínico de gran impacto e interés científico. De acuerdo a la bibliografía consultada el 40% de los pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea, tienen hiperactividad plaquetaria aún después de recibir tratamiento con clopidogrel. La hiperactividad plaquetaria puede tener consecuencias clínicas lamentables.

Uno de los motivos de la hiperactividad plaquetaria, es consecuente a la presencia de polimorfismos que modifican el metabolismo en la absorción del clopidogrel, así como el metabolismo hepático (citocromo P450) y la actividad biológica del receptor plaquetario P2Y12. Estos polimorfismos se describen ampliamente en poblaciones sajonas y asiáticas, sin embargo, es importante destacar que no es posible trasladar los resultados de estos estudios epidemiológicos a todos los grupos étnicos.

En México, se desconocen estudios que muestren la relación de los polimorfismos involucrados en todo el metabolismo del clopidogrel con la baja respuesta. Debido a la elevada frecuencia de baja respuesta al clopidogrel, es necesario considerar el estudio personalizado para mejorar los blancos terapéuticos en cada individuo.

El estudiar los factores genéticos de la absorción, metabolización y bloqueo plaquetario del clopidogrel relacionados con la hiperactividad plaquetaria, es un punto original de estudio en población mexicana.

### **III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la frecuencia de la baja respuesta al clopidogrel y su relación con la presencia de polimorfismos de los genes ABCB1, CYP2C19, CYP3A5 y P2RY12 en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea en el Instituto Nacional de Cardiología?

### **IV. HIPÓTESIS**

La frecuencia de la baja respuesta al clopidogrel está relacionada con la presencia de alguno de los polimorfismos de los genes ABCB1, CYP2C19, CYP3A5 o P2RY12 en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea en el Instituto Nacional de Cardiología.

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Estimar la frecuencia de baja respuesta al clopidogrel y su relación con la presencia de polimorfismos de los genes ABCB1, CYP2C19, CYP3A5 y P2RY12 en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea en el Instituto Nacional de Cardiología.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estimar la frecuencia de la baja respuesta al clopidogrel en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea en el Instituto Nacional de Cardiología.
- Estimar la frecuencia genotípica de los polimorfismos C3435T del gen ABCB1, CYP2C19\*2, CYP2C19\*3, CYP3A5\*3 y del gen P2RY12 los polimorfismos G1233A, G52T y C34T en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea en el Instituto Nacional de Cardiología.
- Determinar la relación de la baja respuesta al clopidogrel con la frecuencia de los polimorfismos C3435T del gen ABCB1, CYP2C19\*2, CYP2C19\*3, CYP3A5\*3 y del gen P2RY12 los polimorfismos G1233A, G52T y C34T en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea en el Instituto Nacional de Cardiología.



## VI. DISEÑO DEL ESTUDIO

Transversal analítico analizado como casos y controles.

## VII. TAMAÑO DE MUESTRA

En un estudio piloto realizado en el Instituto Nacional de Cardiología, se encontró que aproximadamente el 18% de la población sometida a intervención coronaria percutánea podría tener baja respuesta al clopidogrel. Este resultado fue utilizado para sustituir el dato de prevalencia poblacional en la siguiente fórmula:

$$n_1 = \frac{Z_{\alpha/2}^2(p(1-p))}{d^2}$$

$n_1$  = tamaño de muestra

$Z_{\alpha/2}$  = 1.96 cuando el valor de alfa es 0.05

P = prevalencia poblacional (0.18)

d = precisión (0.05)

$Z_{\alpha/2}$  = 1.96

SUSTITUCIÓN:

$$n_1 = \frac{(1.96)^2 (0.18(1-0.18))}{(0.05)^2}$$

$n_1 = 0.5667$

0.0025

$n = 227 + 21\%$  de perdidas = **275 pacientes**

## VIII. METODOLOGÍA

### 8.1 MATERIALES Y REACTIVOS

#### Materiales:

- Tubos BD Vacutainer de 4 mL y de 2 mL con K2 EDTA 7.2 mg como anticoagulante
- Tubos BD Vacutainer de 4 mL y de 1 mL con Citrato de sodio al 3.8% para pruebas regulares de tiempos de coagulación
- Cubetas de cristal siliconizado P/N 312, Chrono-Log capacidad de 450 µL
- Placa PCR de 96 pocillos natural, Cultek marca blanca (cmb)

#### Reactivos:

- Adenosin difosfato liofilizado (ADP) No 384, Chrono-Par, vial con 2.5 mg
- Agua inyectable
- TaqMan Universal Master mix, Applied Biosystem, Ref 4304437
- Ensayos genotípicos TaqMan de 6 sitios polimórficos diferentes, tabla 1.

Tabla 1. Características de los ensayos genotípicos TaqMan de los sitios polimórficos estudiados.

| rs       | Primers [VIC/FAM]  | Catálogo    |
|----------|--|-------------|
| 1045642  | TGTTGGCCTCCTTTGCTGCCCTCAC[A/G]ATCTCTTCCTGTGAC<br>ACCACCCGGC  | 7586657_20  |
| 4244285  | TTCCCACTATCATTGATTATTTCCC[A/G]GGAACCCATAACAAAT<br>TACTTAAAA  | 25986767_70 |
| 4986893  | ACATCAGGATTGTAAGCACCCCCTG[A/G]ATCCAGGTAAGGCC<br>AAGTTTTTTGTC | 27861809_10 |
| 776746   | ATGTGGTCCAAACAGGGAAGAGATA[T/C]TGAAAGACAAAAGA<br>GCTCTTTAAAG  | 26201809_30 |
| 16846673 | TTCATTTGGGTCACCACCATCCTGT[C/T]CTTTTTTCCTATTGTC<br>CTGGGACAG  | 33677020_10 |
| 6809699  | AGTCTCTGGTGCACAGACTGGTGT[AC]CCAGGCGCAGAGGT<br>GAGGTTGTCTGA   | 25640992_10 |
| 6785930  | TGGTGTACCAGGCGCAGAGGTGAG[A/G]TTGTCTGACGGCTTG<br>CATTTCTTGTT  | 25472353_10 |

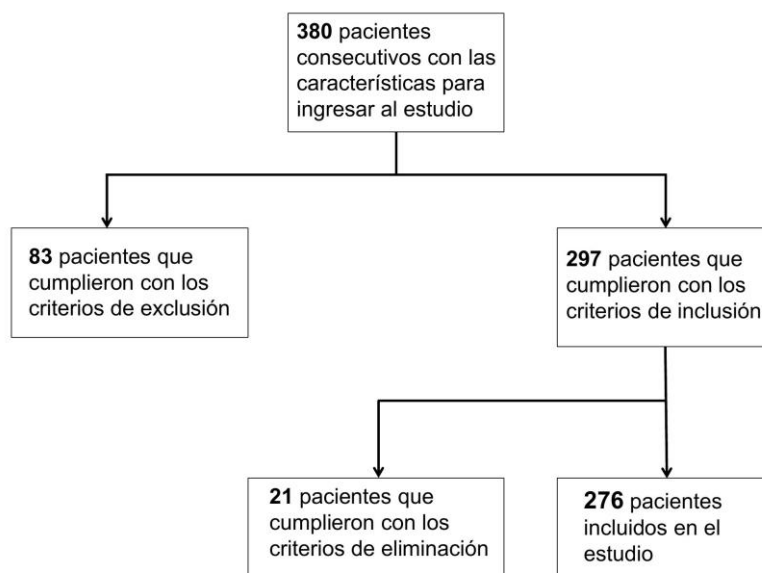
## 8.2 DESCRIPCION OPERATIVA

Se revisó el registro diario de intervenciones coronarias percutáneas en el departamento de hemodinamia del Instituto Nacional de Cardiología y se eligieron a los pacientes de 18 años o más que recibieron una dosis de carga de clopidogrel pre intervención.

Se entrevistó a cada paciente y se invitó a participar explicando ampliamente y por escrito la finalidad del estudio. Cada paciente tuvo que autorizar por escrito la participación en el estudio mediante consentimiento informado. A los pacientes incluidos se les tomó una muestra de sangre periférica en la región antecubital.

Se revisó el expediente clínico y se recolectaron datos en relación a factores de riesgo y cuadro clínico. En la figura 2 se esquematiza la selección de pacientes incluidos.

**Figura 2. Criterios de selección de los pacientes**



### **8.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Pacientes mayores de 18 años, sexo indistinto, sometidos a ICP en el Instituto Nacional de Cardiología, que recibieron una dosis de carga de clopidogrel de 300 o 600 mg con un máximo de 24 horas previas a la toma de muestra sanguínea.

### **8.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- ❑ La omisión del consentimiento informado.
- ❑ Alteraciones hepáticas.
- ❑ Insuficiencia renal.
- ❑ Pacientes con 3 punciones y sin obtención de muestra sanguínea exitosa.
- ❑ Pacientes con enfermedades mentales.

### **8.5 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- ❑ Pacientes con un conteo plaquetario menor a 200 000 plq /  $\mu$ l
- ❑ Pacientes con muestra sanguínea insuficiente para determinar la actividad plaquetaria y los polimorfismos.
- ❑ Pacientes cuya muestra de DNA no haya amplificado.
- ❑ Pacientes con pérdida de información clínica mayor al 5%.

### **8.6 EXTRACCIÓN DE LA INFORMACIÓN CLÍNICA**

La información clínica fue obtenida directamente del paciente por 4 investigadores colaboradores en el desarrollo del estudio, usando una hoja estandarizada de

recolección de datos (anexo 1). La información colectada fue revisada por dos investigadores para verificar la correcta extracción de los datos.

La información clínica de la hoja estandarizada de recolección de datos fue verificada y completada con la información registrada en el archivo electrónico del INC. Los casos con diferencias en la información, fueron discutidos con el médico especialista responsable del paciente.

### **8.7 MUESTRA DE SANGRE**

La muestra de sangre fue obtenida a las 24 h posteriores a la ingesta de la dosis de carga de clopidogrel. Cada enfermo tenía un mínimo de 4 horas de ayuno; y se obtuvo una muestra de 15 mL de sangre periférica por punción antecubital. Nueve mililitros de muestra sanguínea fueron colocados en tubos de plástico que contenían citrato de sodio (3.8%) en relación 1:10 como anticoagulante, para determinar agregación plaquetaria. Seis mililitros de muestra sanguínea fueron colocados en tubos de plástico que contenían EDTA como anticoagulante, para la extracción de DNA.

#### **8.7.1 AGREGACIÓN PLAQUETARIA POR EL MÉTODO ÓPTICO**

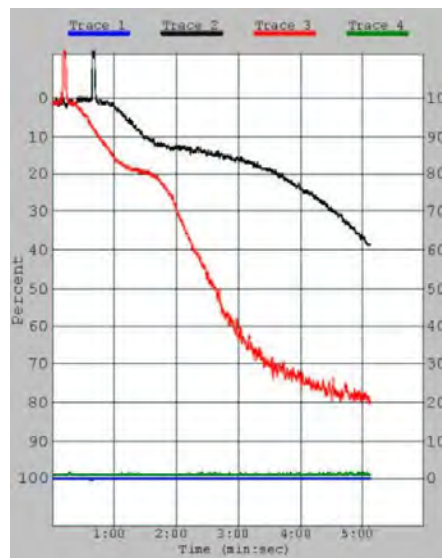
La técnica de agregación plaquetaria por el método óptico, determina la actividad plaquetaria al colocar 0.4 mL de plasma, con una concentración plaquetaria conocida, a 37°C en una cubeta que contenga un agitador magnético. En el agregómetro el agitador rota por una fuerza magnética a 1100 r.p.m. mientras un haz de luz atraviesa la muestra de plasma. Al adicionar un agente agonista a la

muestra, las plaquetas contenidas se activan, y su inicial forma discoidal se modifica adoptando formas irregulares caracterizadas por la presencia de pseudópodos. Posteriormente, las plaquetas se van agregando y eso permite un mayor paso de la luz a través de la muestra de plasma. Estos cambios conformacionales de las plaquetas se registran en el agregómetro acoplado a un programa que construye una curva de agregación. La curva construida representa, en una escala de 0 a 100, el porcentaje de agregación plaquetaria en esa muestra. El agente inductor que se emplea para identificar la resistencia al clopidogrel es el ADP<sup>43</sup>.

Para la estimación de la agregación plaquetaria en este estudio, se obtuvo plasma de las muestras contenidas en los tubos con citrato de sodio. El plasma rico y el plasma pobre en plaquetas fueron obtenidos al centrifugar los tubos con citrato de sodio a 94 g y 1,425 g durante 1.5 min y 20 min respectivamente. El plasma rico en plaquetas (PRP) se diluyó con el plasma pobre (PPP) para ajustar la muestra a una concentración de 200,000 plaquetas /  $\mu$ L. Las muestras fueron procesadas en un Lumi-Agregómetro modelo 560 CA 810 AGGRO software / LINK Chrono-log, Havertown, PA, USA. Se utilizó 10  $\mu$ M de ADP como agente agonista para detectar la baja respuesta al clopidogrel. Los pacientes con una inhibición de la agregación plaquetaria menor al 30% fueron clasificados como pobres respondedores<sup>44</sup>, figura 3.

### Figura 3. Ejemplo de resultado de agregación plaquetaria por el método óptico

La línea roja representa el porcentaje de agregación plaquetaria de un paciente incluido en el estudio, con diagnóstico de baja respuesta al clopidogrel. La línea negra representa un control (individuo sano que no ingiere ningún medicamento) utilizado para mantener la calidad en la prueba.



## 8.8 EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se realizó por un método no enzimático previamente descrito<sup>45</sup>. Con el fin de disminuir la variabilidad interensayo, el DNA obtenido de cada sujeto, se ajustó a 10 ng/ $\mu$ L y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta obtener un número considerable de muestras para someterlo en grupos al análisis genómico.

## 8.9 PCR EN TIEMPO REAL

Existen diversos métodos que pueden utilizarse para determinar polimorfismos genéticos. Algunos métodos son: fragmentos de restricción de longitud polimórfica, PCR en tiempo final, PCR en tiempo real y secuenciación directa. En este estudio, se utilizó la PCR en tiempo real, ya que es el estándar de oro para la genotipificación y la discriminación alélica.

La PCR cuantitativa en tiempo real se fundamenta en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El beneficio de esta técnica es que amplifica moléculas específicas de DNA y al mismo tiempo las cuantifica. Lo anterior a través de

elementos ópticos integrados al termociclador así como de marcadores fluorescentes que proporcionan información de la amplificación a lo largo de los ciclos<sup>46;47</sup>.

Para la detección de genes y polimorfismos específicos, se utilizan sondas fluorescentes de ácidos nucleicos. Éstas sondas emiten señales luminosas que son detectadas por los elementos ópticos del termociclador a medida que se va obteniendo el producto de la PCR<sup>46;48</sup>.

### **8.9.1 SITIOS POLIMÓRFICOS ANALIZADOS**

En la tabla 2 se indican los polimorfismos analizados en este estudio.

Tabla 2. Información de los polimorfismos estudiados.

| <b>rs</b> | <b>Sitio polimórfico</b> | <b>Codones afectados</b> | <b>Ubicación del polimorfismo</b> | <b>Efecto</b>  | <b>Referencias</b>   |
|-----------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--|--|
| 1045642   | ABCB1                    | C3435T                   | Exón 26                           | Resulta en una reducción de la expresión de MDR1 en el duodeno. No modifica la cadena de AA. | - Owen A, et al. Br J Clin Pharmacol 2005; 59(3): 365-370<br>-Kimchi-Sarfaty C, et al. Pharmacogenomics 2007 ; 8(1): 29-39 |
| 4244285   | CYP2C19*2                | G681A                    | Exón 5                            | Reduce la cantidad de metabolito activo, obtenido por la vía hepática. Defecto splicing      | -Geisler T, et al. Pharmacogenomics 2008; 9(9):1251-9.<br>-Pereillo JM, et al. Drug Metab Dispos 2002; 30(11):1288-95.     |



|          |           |        |          |  |   |
|----------|-----------|--------|----------|--|---|
| 4986893  | CYP2C19*3 | G636A  | Exón 4   | Codón de "stop" prematuro  | J-innai T, et al. Circ J 2009; 73(8):1498-503<br>-Hulot JS, et al. Blood 2006;108(7):2244-7                         |
| 776746   | CYP3A5*3  | A6986G | Intrón 3 | Lleva a una proteína no funcional. Afecta el mecanismo de oxidación del clopidogrel a 2-oxoclopidogrel. Defecto splicing | -Nguyen TA, et al. J Am Coll Cardiol 2005; 45:1157-64<br>-Lugo JJ, et al. Rev Esp Cardiología 2006; 6(Supl H):49-56 |
| 16846673 | P2RY12    | G1233A | intrón   | Cambia un glutamato a una glicina. Se desconoce el mecanismo por el cual genera hiperactividad plaquetaria.              | -Lev EI, et al. Thrombosis Research 2007; 119, 355—360<br>-Hap Map  |
| 6809699  | "         | G52T   | Exón 2   | No altera los aminoácidos. Se desconoce el mecanismo por el cual genera hiperactividad plaquetaria.                      | Fontana P, et al. Circulation 2003; 108;989-995   |
| 6785930  | "         | C34T   | Exón 2   | No altera los aminoácidos. Se desconoce el mecanismo por el cual genera hiperactividad plaquetaria.                      | Fontana P, et al. Circulation 2003; 108;989-995   |

La detección de los polimorfismos de un solo nucleótido en el DNA genómico, se realizó con PCR en tiempo real usando Ensayos Genotípicos TaqMan 5´exonucleasa, TaqMan Universal PCR Master Mix, agua inyectable y DNA [10 ng/ $\mu$ L], en placas para PCR de 96 pocillos. A cada pocillo se le colocó un volumen final de 10  $\mu$ L de acuerdo a la siguiente distribución:

- 5  $\mu$ L de Universal PCR Master Mix
- 0.75  $\mu$ L de agua inyectable
- 0.25  $\mu$ L Ensayos Genotípicos TaqMan
- 4  $\mu$ L DNA [10 ng/  $\mu$ L]

El ciclo térmico del protocolo de la PCR en tiempo real fue el siguiente:

- Etapa 1, un ciclo de 2 minutos a 50°C
- Etapa 2, un ciclo de 10 minutos a 95°C
- Etapa 3, cuarenta ciclos de 15 segundos a 95°C
- Elongación, un minuto a 60°C

El análisis se realizó en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, foster City, CA, USA).

## **8.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### Análisis estadístico descriptivo:

- Para variables continuas y discretas medidas de tendencia central. Media con desviación estándar o medianas con rangos según la distribución de las variables.
- Para variables cualitativas se calcularon frecuencias y proporciones.
- Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los genes analizados se obtuvieron por conteo directo.

### Análisis bivariado:

- Comparación de grupos (pacientes con baja y adecuada respuesta al clopidogrel) usando, en variables continuas, la prueba T de student o U de Mann Whitney dependiendo de la distribución de las variables. En variables cualitativas se calculó chi cuadrada.
- Correlación de Pearson para variables continuas con distribución normal y correlación de Spearman para variables continuas sin distribución normal o para variables cualitativas.
- Razón de momios con intervalos de confianza 95%.
- Para evaluar el equilibrio genético en la población de estudio, se utilizó el principio de Hardy-Weinberg usando el método de chi cuadrada.
- Se calculó la hipótesis de herencia de acuerdo a 4 modelos: co-dominante, dominante, recesivo y el de ventaja heterocigótica.

### Análisis multivariado:

- Se calculó un modelo de regresión logística.

## **8.11 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética Humana y por el Consejo de Investigación Médica del INC. Este proyecto fue una investigación con riesgo mínimo. El estudio no transgrede los principios básicos de la bioética: Beneficencia, no maleficencia, autonomía y justicia. El estudio se apega al Código de Nuremberg<sup>49</sup> y a la Declaración de Helsinki<sup>50</sup>.

## **IX. RESULTADOS**

### **9.1 AGREGACIÓN PLAQUETARIA**

La frecuencia de la baja respuesta al clopidogrel fue de 22.1%, tabla 3.

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los pacientes

| <b>Variable</b>          | <b>Todos los pacientes<br/>N= 276 (100%)</b> | <b>Adecuada respuesta al clopidogrel<br/>N= 215 (77.9%)</b> | <b>Baja respuesta al clopidogrel<br/>N= 61 (22.1%)</b> | <b>Valor P</b> |
|--------------------------|--|---|--|----------------|
| Edad $\bar{x} \pm DE$    | 60.37 $\pm$ 10.51                            | 60.1 $\pm$ 10.52  | 61.33 $\pm$ 10.504                                     | 0.421          |
| Sexo:                    |  |   |  |                |
| Hombres n (%)            | 246(89.1)                                    | 193 (89.8)  | 53 (86.9)  | 0.523          |
| Mujeres n (%)            | 30 (10.9)                                    | 22 (10.2)   | 8 (13.1)   |                |
| Tabaquismo n (%)         | 103 (37.3)                                   | 85 (39.7)   | 18 (29.5)  | 0.146          |
| Diabetes Mellitus n (%)  | 117 (42.4)                                   | 92 (43.2)   | 25 (41)  | 0.758          |
| Consumo de alcohol n (%) | 43 (15.6)                                    | 32 (14.9)   | 11 (18)  | 0.559          |
| Dislipidemia n (%)       | 115 (42.1)                                   | 86 (40.4)   | 29 (48.3)  | 0.270          |

|   |               |               |               |         |
|---|---------------|---------------|---------------|---------|
| Hipertensión n (%)                                | 156 (56.7)    | 118 (55.1)    | 38 (62.3)     | 0.320   |
| IMC Kg/m <sup>2</sup> $\bar{x}$ ±DE               | 27.1 ±3.83    | 27.01 ±3.73   | 27.42 ±4.21   | 0.450   |
| Dosis de carga de clopidogrel:                    |               |               |               |         |
| 600 mg n (%)                                      | 189 (68.7)    | 149 (69.6)    | 40 (65.6)     | 0.547   |
| 300 mg n (%)                                      | 86 (31.3)     | 65 (30.4)     | 21 (34.4)     |         |
| Porcentaje de agregación plaquetaria mediana ± DE | 24 ±13.63     | 21 ±9.018     | 43 ±7.869     | <0.001* |
| Ingesta de omeprazol n (%)                        | 88 (31.9)     | 70 (32.6)     | 18 (30)       | 0.88    |
| Glc mediana ± DE                                  | 113 ± 50.04   | 113 ± 4.92    | 114 ± 2.474   | 0.951   |
| Leuc mediana ± DE                                 | 8 ± 2.61      | 7.8 ± 2.63    | 8.55 ± 2.47   | 0.021*  |
| Plq mediana ± DE                                  | 200 ± 67.55   | 199.5 ± 68.43 | 202.5 ± 64.98 | 0.816   |
| Chol $\bar{x}$ ± DE                               | 166 ± 46.12   | 164 ± 44.67   | 172 ± 50.43   | 0.286   |
| HDL $\bar{x}$ ± DE                                | 35.89 ± 9.93  | 35.63 ± 9.57  | 36.77 ± 11.2  | 0.520   |
| LDL $\bar{x}$ ± DE                                | 97.04 ± 37.17 | 94.02 ± 3.06  | 107.1 ± 45.1  | 0.090   |
| Tgl mediana ± DE                                  | 139 ± 124.75  | 139 ± 135.5   | 139 ± 80.80   | 0.835   |

\* Significancia estadística p< 0.05

Consumo de alcohol: Ingesta de al menos un trago estándar por día (14 g ó 0.6 oz de alcohol puro); IMC: Índice de masa corporal; Glc: Glucosa; Leuc: Leucocitos; Plq: Plaquetas; Chol: Colesterol; HDL: Lípidos de alta densidad; LDL: Lípidos de baja densidad; Tgl: Triglicéridos.

Para determinar el efecto de la dosis de carga del clopidogrel se comparó la proporción de pacientes con baja respuesta y el porcentaje de agregación plaquetaria en estos grupos (300 mg y 600 mg). El 24.4 % y el 21.2 % de los pacientes tuvieron baja respuesta al clopidogrel en los grupos de 300 mg y 600 mg, respectivamente, tabla 4. No hubo diferencia estadística significativa, por lo que se puede concluir que la dosis de carga no interfirió en la clasificación de los pacientes con baja y adecuada respuesta.

Tabla 4. Comparación de los grupos de dosis de carga de clopidogrel

| <b>Variable</b>                                       | <b>300 mg de clopidogrel<br/>86 (31.3%)</b> | <b>600 mg de clopidogrel<br/>190 (68.7%)</b> | <b>p</b> |
|---|---|--|----------|
| Baja respuesta al clopidogrel n (%)                   | 21 (24.4)                                   | 40 (21.2)                                    | 0.547    |
| Porcentaje de agregación plaquetaria mediana y rangos | 24.5 con un rango de 53, de 2 a 55          | 24 con un rango de 68, de 0 a 68             | 0.295    |

Para conocer la fuerza y la dirección de la baja respuesta al clopidogrel con cada una de las variables analizadas, se ejecutó un análisis de correlación, tabla 5. La baja respuesta al clopidogrel se correlacionó positivamente con el porcentaje de agregación plaquetaria, la concentración de leucocitos en sangre y la concentración de LDL en suero ( $r = 0.719$ ,  $p < 0.001$ ;  $r = 0.144$ ,  $p = 0.021$  y  $r = 0.149$ ,  $p = 0.047$ ; respectivamente). Estas correlaciones indican que cuando aumenta el número de pacientes con baja respuesta al clopidogrel, también aumenta la mediana del porcentaje de agregación plaquetaria, la concentración de leucocitos en sangre y la concentración de LDL en suero.

Tabla 5. Análisis de correlación de la baja respuesta al clopidogrel con las variables de estudio

| Variable                             | Correlación con baja respuesta al clopidogrel |         |
|--------------------------------------|---|---------|
|                                      | Coefficiente de correlación                   | Valor p |
| Edad                                 | 0.049   | 0.472   |
| Sexo                                 | -0.038  | 0.525   |
| Tabaquismo                           | -0.088  | 0.147   |
| Diabetes Mellitus                    | -0.019  | 0.760   |
| Consumo de alcohol                   | 0.035   | 0.561   |
| Dislipidemia                         | 0.067   | 0.272   |
| Hipertensión                         | 0.060   | 0.322   |
| IMC Kg/m <sup>2</sup>                | 0.046   | 0.450   |
| Dosis de carga de clopidogrel        | -0.036  | 0.549   |
| Porcentaje de agregación plaquetaria | 0.719   | <0.001* |
| Glc                                  | 0.004   | 0.951   |
| Leuc                                 | 0.144   | 0.021*  |
| Plq                                  | 0.015   | 0.816   |
| Chol                                 | 0.75  | 0.253   |
| HDL                                  | 0.49  | 0.520   |
| LDL                                  | 0.149   | 0.047*  |
| Tgl                                  | -0.014  | 0.836   |

\* Significancia estadística  $p < 0.05$

Consumo de alcohol: Ingesta de al menos un trago estándar por día (14 g ó 0.6 oz de alcohol puro); IMC: Índice de masa corporal; Glc: Glucosa; Leuc: Leucocitos; Plq: Plaquetas; Chol: Colesterol; HDL: Lípidos de alta densidad; LDL: Lípidos de baja densidad; Tgl: Triglicéridos.

## 9.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Todos los polimorfismos estudiados estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El genotipo TT del polimorfismo C3435T del gen ABCB1, fue el único que se asoció con la baja respuesta al clopidogrel (OR 2.4, p = 0.001), tabla 6. Las frecuencias de los polimorfismos del citocromo P450 (CYP2C19\*2, CYP2C19\*3 and CYP3A5\*3) fueron 3 veces menores que las reportadas para poblaciones caucásicas y japonesas<sup>14;40</sup>. Por otro lado, ninguno de los polimorfismos del gen P2RY12 se relacionó con la baja respuesta al clopidogrel. Con respecto al gen ABCB1, el riesgo de tener baja respuesta al clopidogrel fue dos veces mayor en los portadores del polimorfismo C3435T genotipo TT que en los portadores del genotipo CC o CT (OR 2.4, IC 1.23-4.66, P = 0.015; tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados en los grupos con adecuada y baja respuesta al clopidogrel

| Genotipo                       |    | Adecuada respuesta al clopidogrel<br>N= 215<br>(77.9%) | Baja respuesta al clopidogrel<br>N= 61 (22.1%) | OR   | 95% C.I.    | P      |
|--------------------------------|----|--|--|------|-------------|--------|
| ABCB1-3435 C/T (rs 1045642)    |    |  |  |      |             |        |
| Alelos                         | C  | 253 (59)   | 56 (46)  | 1.21 |             |        |
|                                | T  | 177 (41)   | 66 (54)  | 0.83 |             |        |
| Genotipos                      | CC | 70 (32.6)  | 13 (21.3)                                      |      |             |        |
|                                | CT | 113 (52.6)   | 30 (49.2)                                      |      |             |        |
|                                | TT | 32 (14.9)  | 18 (29.5)                                      | 2.4  | 1.23 - 4.66 | 0.0015 |
| CYP2C19*2-681 G/A (rs 4244285) |    |  |  |      |             |        |
| Alelos                         | G  | 365 (85.2)   | 101 (82.8)                                     |      |             |        |
|                                | A  | 63 (14.8)  | 21 (17.2)                                      |      |             |        |
| Genotipos                      | GG | 161 (74.9)   | 42 (68.9)                                      |      |             |        |
|                                | GA | 43 (20.0)  | 17 (27.9)                                      |      |             |        |
|                                | AA | 10 (4.7)   | 2 (3.3)  |      |             | NS     |



| CYP2C19*3-636 G/A (rs 4986893) |    |            |            |  |  |     |
|--------------------------------|----|------------|------------|--|--|-----|
| Alelos                         | G  | 215 (99.5) | 122 (100)  |  |  |     |
|                                | A  | 1 (0.5)    | 0          |  |  |     |
| Genotipos                      | GG | 214 (99.5) | 61 (100)   |  |  |     |
|                                | GA | 1 (0.5)    | 0          |  |  |     |
|                                | AA | 0          | 0          |  |  | NS  |
| CYP3A5*3-6986 G/A (rs 776746)  |    |            |            |  |  |     |
| Alelos                         | G  | 391 (91)   | 104 (85.2) |  |  |     |
|                                | A  | 39 (9)     | 18 (14.8)  |  |  |     |
| Genotipos                      | GG | 178 (82.3) | 45 (73.8)  |  |  |     |
|                                | GA | 35 (16.3)  | 14 (23)    |  |  |     |
|                                | AA | 2 (0.9)    | 2 (3.3)    |  |  | NS  |
| P2RY12-33 G/A (rs16846673)     |    |            |            |  |  |     |
| Alelos                         | G  | 0          | 0          |  |  |     |
|                                | A  | 215 (100)  | 61 (100)   |  |  |     |
| Genotipos                      | GG | 0          | 0          |  |  |     |
|                                | GA | 0          | 0          |  |  |     |
|                                | AA | 215 (100)  | 61 (100)   |  |  | N/A |
| P2RY12-52 G/T (rs 6809699)     |    |            |            |  |  |     |
| Alelos                         | G  | 368 (86)   | 99 (81.1)  |  |  |     |
|                                | T  | 60 (14)    | 23 (18.9)  |  |  |     |
| Genotipos                      | GG | 160 (74.4) | 39 (63.9)  |  |  |     |
|                                | GT | 48 (22.3)  | 21 (34.4)  |  |  |     |
|                                | TT | 6 (2.8)    | 1 (1.6)    |  |  | NS  |
| P2RY12-34 C/T (rs 6785930)     |    |            |            |  |  |     |
| Alelos                         | C  | 306 (71.5) | 87 (71.3)  |  |  |     |
|                                | T  | 122 (28.5) | 35 (28.7)  |  |  |     |
| Genotipos                      | CC | 112 (52.1) | 30 (49.2)  |  |  |     |
|                                | CT | 82 (38.1)  | 27 (44.3)  |  |  |     |
|                                | TT | 20 (9.3)   | 4 (6.6)    |  |  | NS  |

NS = No significativo

N/A = No aplica

\* Significancia estadística  $p < 0.05$

La hipótesis de herencia para el polimorfismo C3435T del gen ABCB1 fue calculada usando 4 modelos: el co-dominante, el dominante, el recesivo y el de ventaja heterocigótica (tabla 7). De acuerdo al modelo dominante, el riesgo de tener baja respuesta al clopidogrel incrementó 2.39 veces en los portadores del genotipo TT comparado con los portadores del genotipo CT o CC ( $p=0.009$ ). No hubo significancia estadística en el resto de los modelos.

Tabla 7. Modelos de herencia del polimorfismo C3435T del gen ABCB1

| Modelos de herencia    | Genotipo          | OR   | I.C 95%       | P      |
|------------------------|-------------------|------|---------------|--------|
| Co-dominante           | CC                | 1    |               |        |
|                        | CT                | 1.43 | 0.7 – 2.93    | NS     |
|                        | TT                | 3.03 | 1.325 – 6.925 | 0.007* |
| Dominante              | TT vs.<br>CT + CC | 2.39 | 1.23 – 4.66   | 0.009* |
| Recesivo               | CC vs.<br>CT + TT | 0.56 | 0.285 – 1.103 | NS     |
| Ventaja heterocigótica | CT vs.<br>CC + TT | 0.87 | 0.495 – 1.543 | NS     |

NS = No significativo

\* Significancia estadística  $p < 0.05$

### **9.3 MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA**

Se ejecutó un modelo de regresión logística que se ajustó por las variables edad, sexo, diabetes mellitus, ingesta de omeprazol, concentración de leucocitos en sangre y el genotipo TT del polimorfismo C3435T del gen ABCB1. Las variables que se integraron en el modelo, fueron elegidas en su mayoría por tener significancia estadística en el análisis bivariado. De acuerdo a los resultados del modelo, tanto el genotipo TT como la ingesta de omeprazol se asociaron con la

baja respuesta al clopidogrel (Exp ( $\beta$ ) 2.73,  $p = 0.009$  y Exp ( $\beta$ ) 3.86,  $p = 0.04$ , respectivamente), como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Modelo de regresión logística

| Variable                          | Exp ( $\beta$ ) | P      | IC 95%       |
|-----------------------------------|-----------------|--------|--------------|
| Polimorfismo C3435T (Genotipo TT) | 2.73            | 0.009* | 1.28 – 5.81  |
| Omeprazol                         | 3.86            | 0.04*  | 1.02 – 14.66 |
| Leucocitos                        | 1.1             | 0.11   | 0.97 – 1.25  |

\* Significancia estadística  $p < 0.05$

En este estudio se consideraron todos los medicamentos que estaban tomando los pacientes al momento de la toma de muestra, entre estos medicamentos destacan los inhibidores de la GPIIb/IIIa, anticoagulantes y estatinas. Sin embargo, la única relación estadísticamente significativa que se encontró fue la del omeprazol con la baja respuesta al clopidogrel.

## X. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio, ningún polimorfismo del CYP se asoció con baja respuesta al clopidogrel. Un estudio realizado en otra institución de salud Mexicana, reportó resultados similares a estos<sup>58</sup>. El genotipo más frecuente del polimorfismo CYP3A5\*3 fue GG, seguido del genotipo GT, por otro lado el genotipo TT tuvo una frecuencia por debajo del 9%, así como lo reportó Isordia-Salas et al. El polimorfismo CYP2C19\*3 (rs 4986893) no se detectó en la población de estudio. Las frecuencias de los polimorfismos CYP2C19\*2, CYP2C19\*3 y CYP3A\*3, fueron menores en la población estudiada que en las poblaciones caucásicas y

japonesas<sup>14;40</sup>. La Food and Drug Administration (FDA) advierte del uso de clopidogrel en pacientes portadores del polimorfismo CYP2C19\*2, sin embargo esta recomendación está basada en estudios realizados en población caucásica<sup>51</sup>. De acuerdo a los resultados de este estudio, la recomendación de la FDA con respecto a la ingesta de clopidogrel en portadores del polimorfismo CYP2C19\*2 no puede ser aplicada a la población mexicana. Por lo que los resultados de un solo estudio, aunque tenga un tamaño de muestra grande, no pueden ser extrapolados a todas las poblaciones.

El papel de los polimorfismos del gen P2RY12 en la baja respuesta al clopidogrel ha tenido diferentes resultados en diversos estudios, debido quizá al pequeño número de pacientes incluidos y a la ausencia del estudio de cada uno de los loci del gen. Una investigación que incluyó 1031 individuos, identificó variaciones en el gen P2RY12, las cuales estuvieron relacionadas con la baja respuesta al clopidogrel<sup>52</sup>. Sin embargo, este estudio no consideró diferencias en los antecedentes étnicos de los pacientes incluidos. En nuestro estudio se observó que los polimorfismos del gen P2RY12 no contribuyen a la baja respuesta al clopidogrel en pacientes mexicanos.

Los portadores del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 (rs 1045642) tuvieron un elevado riesgo de baja respuesta al clopidogrel. El gen ABCB1 codifica para la glicoproteína P, la cual se expresa en el duodeno y limita la absorción del

clopidogrel<sup>53</sup>. El genotipo TT del polimorfismo C3435T contribuye en las bajas concentraciones plasmáticas del metabolito activo del clopidogrel, a través de un mecanismo todavía incierto. Se ha sugerido que el genotipo TT disminuye la absorción intestinal del clopidogrel<sup>54;55</sup> y que el aumento en las dosis de este medicamento podría mejorar la absorción y por lo tanto la inhibición de la agregación plaquetaria<sup>54;56</sup>. En este estudio, no hubo diferencia significativa en el porcentaje de agregación plaquetaria entre los pacientes que recibieron 300 o 600 mg de clopidogrel, este resultado pudo ser debido a la variabilidad que existe en la prueba de agregación plaquetaria. Otra posible explicación, puede ser debido al tamaño de la muestra, los estudios que han encontrado diferencia en la agregación plaquetaria entre diferentes dosis de clopidogrel, han incluido un gran número de pacientes (mayor a 500)<sup>54;56</sup>, en este estudio el número de pacientes incluidos fue pequeño (276).

La distribución del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 (rs1045642) es similar entre mexicanos, asiáticos y sudamericanos, pero difiere de los caucásicos y los africanos<sup>57</sup>. En este estudio, se aborda el fenómeno de la baja respuesta al clopidogrel desde diferentes perspectivas estudiando los polimorfismos involucrados en la absorción, el metabolismo hepático y la actividad del receptor P2Y12.

Se encontró una frecuencia de baja respuesta al clopidogrel de 22.1%. Esta frecuencia difiere de la reportada en otra institución de salud Mexicana (60%)<sup>58</sup>. Una posible explicación a la discrepancia de estos resultados incluye: A) La ausencia de un consenso en las variables que afecten los resultados, o la concentración de ADP utilizada para inducir la agregación plaquetaria, o el tiempo en el que las muestras de sangre fueron colectadas; B) Diferencias en el punto de corte de la agregación plaquetaria utilizado para identificar a los pacientes con baja respuesta ; y C) Diferencias en los métodos utilizados para determinar la baja respuesta al clopidogrel, pese a que la agregación plaquetaria por el método óptico es considerada el estándar de oro<sup>18</sup>.

Anteriormente se ha relacionado al omeprazol con la baja respuesta al clopidogrel<sup>23;59</sup>. El uso concomitante de omeprazol y clopidogrel debería evitarse debido a que estos dos agentes de manera competitiva inhiben la isoenzima CYP2C19, la cual participa en la generación del metabolito activo del clopidogrel, reduciendo así la capacidad del clopidogrel para inhibir adecuadamente la agregación plaquetaria<sup>60</sup>. En este estudio, la ingesta de omeprazol resultó ser un factor de riesgo para el desarrollo de la baja respuesta al clopidogrel.

Sin embargo, este estudio también tiene varias limitaciones, incluyendo el tamaño de muestra pequeño y la ausencia del estudio de la paraoxonasa-1 (PON1) en la actividad del clopidogrel. Evidencia reciente ha demostrado que la enzima PON-1

puede ser un importante determinante farmacocinético de la eficacia del clopidogrel<sup>61</sup>.

Existen diversos estudios referentes a la baja respuesta al clopidogrel y su relación con polimorfismos y eventos vasculares recurrentes hasta en un periodo de 12 meses. Recientes investigaciones han demostrado que las capacidades metabólicas de cada individuo (metabolizadores rápidos, intermedios y pobres) pueden interferir con la respuesta al clopidogrel. En este sentido, los metabolizadores rápidos e intermedios tienen una mejor respuesta al clopidogrel que los pobres metabolizadores<sup>62</sup>. Estas observaciones no fueron consideradas en este estudio.

Investigaciones adicionales, con un mayor número de pacientes, son necesarias para poder comprender la relación del genotipo TT del polimorfismo C3435T del gen ABCB1 con la absorción intestinal del clopidogrel. Sin embargo, se espera que los resultados de este estudio motiven al desarrollo de investigaciones relacionadas con los resultados obtenidos.

En conclusión, el genotipo TT del polimorfismo C3435T está relacionado con la baja respuesta al clopidogrel en pacientes mexicanos. Sin embargo, es necesario considerar otros mecanismos celulares y farmacocinéticos que pudieran estar involucrados con esta baja respuesta.

## **XI. ANEXOS**

### ***ANEXO I*** **HOJA DE RECOLECCION DE DATOS**

#### **DATOS GENERALES DEL PACIENTE**

NOMBRE: \_\_\_\_\_

EDAD:

LUGAR DE NACIMIENTO:

PACIENTE:

LUGAR DE NACIMIENTO DEL PADRE:

LUGAR DE NACIMIENTO DE LA MADRE:

LUGAR DE NACIMIENTO DE ABUELOS PATERNOS:

LUGAR DE NACIMIENTO DE ABUELOS MATERNOS:

FECHA DE NACIMIENTO (DÍA/MES/AÑO): (\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_)

ESCOLARIDAD: \_\_\_\_\_

Tabaco:

Diabetes mellitus:

Alcohol:

Hipertensión arterial:



## **ANEXO II**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo \_\_\_\_\_

**Declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio:**  
“FRECUENCIA DE RESISTENCIA AL CLOPIDOGREL ASOCIADA A LA  
PRESENCIA DE VARIANTES ALÉLICAS DE LOS GENES ABCB1 Y CYP2C19  
EN PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA”

Los propósitos del estudio son identificar la presencia de una variante genética y la posible respuesta inadecuada al clopidogrel, en pacientes cardiopatas que se encuentran bajo tratamiento con este medicamento. Con lo anterior podría en un futuro, beneficiar a estos pacientes con nuevos tratamientos. El estudio representa riesgo mínimo para su salud o para la evolución de su padecimiento.

Para fines del estudio tomaremos una muestra de 15 mL de sangre venosa con material estéril y nuevo.

Puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio tanto en el Instituto Nacional de Cardiología como en la Facultad de Medicina de la UNAM.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme del presente estudio en el momento que así lo desee.

En caso de que decidiera no participar, la atención que como paciente recibo en el Instituto Nacional de Cardiología no se verá afectada.

\_\_\_\_\_  
**FIRMA**

\_\_\_\_\_  
**TESTIGO**

**Fecha:**

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

<sup>1</sup><http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

<sup>2</sup> Martínez Sánchez CR. Panorama del IAM con elevación del segmento ST en México. Rev Fed Arg Cardiol 2013; 42: 168-169.

<sup>3</sup>Davi G, Patrono C. Platelet Activation and Atherothrombosis Mechanisms of Disease. NEJM 2007; 24: 2482.

<sup>4</sup>Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Williams JW. Manual de hematología. 4a ed. Madrid: marbán, 2005.

<sup>5</sup> M. Bonaca, R.P. Giugliano. Antithrombotics in acute coronary syndromes: updates from the past year. Curr Treat Options Cardiovasc Med 2010; 12: 84-89.

<sup>6</sup> Grove EL, Würtz M, Thomas MR, Kristensen SD. Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes. Expert Opin Pharmacother 2015; 21: 1-15.

<sup>7</sup>Dörffler-Melly J, Koopman MMW, Prins MH, Büller HR. Antiplaquetarios y anticoagulantes para la prevención de la restenosis/reoclusión posterior al tratamiento endovascular periférico (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2008 Número 2. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2008 Issue 2. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.)

---

<sup>8</sup>Keller TT, Squizzato A, Middeldorp S. Clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone for preventing cardiovascular disease (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2009.

<sup>9</sup>Torpy JM, Lynn C, Glass RM. Intervención coronaria percutánea. JAMA 2004; 291: 778.

<sup>10</sup> Lugo JJ, Hurtado EF, Calderón LI, Gómez G, Castro P, Estrada G, Fonseca JA. Resistencia al ácido acetil salicílico y al clopidogrel: una entidad clínica emergente. Rev Col Cardiol 2008; 15: 172-183.

<sup>11</sup>Badimon L, Vilahur G. Enfermedad aterotrombótica coronaria: avances en el tratamiento antiplaquetario. Rev Esp Cardiol 2008; 61: 501-13.

<sup>12</sup>Izaguirre Ávila R, De la Peña A, González Pacheco H, Ramírez Gutiérrez A, González Valdez H, Quiroz A, et al. Eficacia Del Clopidogrel Como Inhibidor de la Agregación Plaquetaria Dependiente de ADP. Un Estudio en Individuos con Enfermedad Arterial Coronaria. Arch Inst Cardiol Mex 2000; 70: 472-480.

<sup>13</sup> Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP, Fischer B, Valina CM, Ferenc M, Gick M, Caputo A, Büttner HJ, Neumann FJ. Impact of the Degree of Peri-Interventional Platelet Inhibition After Loading With Clopidogrel on Early Clinical Outcome of Elective Coronary Stent Placement. J Am Coll Cardiol 2006; 48: 1742-50.

<sup>14</sup> Mijajlovic MD, Shulga O, Bloch S, Covickovic-Sternic N, Aleksic V, Bornstein NM. Clinical consequences of aspirin and clopidogrel resistance: an overview. Acta Neurol Scand 2013; 128: 213-9.

---

<sup>15</sup>Baraona F, Guarda E, Ocaranza MP. Polimorfismo del receptor P2Y<sub>12</sub> de ADP plaquetario en pacientes con enfermedad coronaria y variabilidad en agregación plaquetaria: Resultados preliminares. *Rev Chil Cardiol* 2006; 25: 9-14.

<sup>16</sup> Patni R, Nawaz MA, Macys A, Chan KM, Punjabi P. Assessment of Platelet Function in Patients on Antiplatelet Therapy Undergoing Cardiac Surgery: A Review. *Heart Lung Circ* 2012; 21: 455-62.

<sup>17</sup>Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, et al. Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel. *NEJM* 2009; 360: 354.

<sup>18</sup>De Miguel Castro A, Cuellas Ramón C, Diego Nieto A, Samaniego Lampón B, Rodríguez DA, Fernández Vázquez F. La reactividad plaquetaria post-tratamiento predice los eventos adversos a largo plazo mejor que la respuesta al clopidogrel en pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST. *Rev Esp Cardiol* 2009; 62: 126-35.

<sup>19</sup>Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US. The Relation of Dosing to Clopidogrel Responsiveness and the Incidence of High Post-Treatment Platelet Aggregation in Patients Undergoing Coronary Stenting. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1392– 6.

<sup>20</sup>Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E. Assessment, Mechanisms, and Clinical Implication of Variability in Platelet Response to Aspirin and Clopidogrel Therapy. *Am J Cardiol* 2009; 104: 227–233.

<sup>21</sup>Cortina Evelyn, Huerta Margarita, González Héctor, Cantú Carlos, Izaguirre Raúl. Resistencia al efecto del clopidogrel en supervivientes de infarto agudo del

---

miocardio y enfermedad cardiovascular cerebral medida por agregometría plaquetaria y tiempo de hemorragia de IVY. *Rev Hematol* 2004; 5(suplemento1): 28.

<sup>22</sup>Feliciano-Ruiz G, Azpiri-López JR, Marfil Rivera J. Determinación de la prevalencia de resistencia al clopidogrel en pacientes con cardiopatía isquémica estable. *Arch Card Mex* 2009; 79(suplemento1): 29.

<sup>23</sup>Gilard M, Arnaud B, Le Gal G, Abgrall JF, Bosch J. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2508–9.

<sup>24</sup>Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Kopensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Adenosine diphosphate-inducible platelet reactivity shows a pronounced age dependency in the initial phase of antiplatelet therapy with clopidogrel. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 37–42.

<sup>25</sup>Tanaka E. In vivo age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans. *J Clin Pharm Ther* 1998; 23: 247–55.

<sup>26</sup>Bonello-Palot N, Armero S, Paganelli F, Manzini J, et al. Relation of Body Mass Index to High On-Treatment Platelet Reactivity and of Failed Clopidogrel Dose Adjustment According to Platelet Reactivity Monitoring in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Am J Cardiol* 2009; 104: 1511–1515.

<sup>27</sup>Berger JS, Bhatt DL, Steinhubl SR, Shao M, Steg PG, Montalescot G, et al. Smoking, Clopidogrel, and Mortality in Patients With Established Cardiovascular Disease. *Circulation* 2009; 120: 2337-2344.

---

<sup>28</sup>Angiolillo DJ & Suryadevara S. Aspirin and clopidogrel: efficacy and resistance in diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23: 375–388.

<sup>29</sup> Ma MK, Woo MH, McLeod HL. Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm* 2002; 206: 1-2069.

<sup>30</sup>Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006; 108: 2244-2247.

<sup>31</sup> Śpiewak M, Małek LA, Kostrzewa G, Kisiel B, Serafin A, Filipiak KJ, et al. Influence of C3435T multidrug resistance gene-1 (MDR-1) polymorphism on platelet reactivity and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Kardiol Pol* 2009; 67: 827-34.

<sup>32</sup>David R. Holmes, Gregory J. Dehmer, Sanjay Kaul, Dana Leifer, et al. ACCF/AHA Clopidogrel Clinical Alert: Approaches to the FDA “Boxed Warning”. *JACC* 2010; 56: 321-41.

<sup>33</sup>Bi-Lian C, Wei Z, Qing L, Ya-Lin L, Yi-Jing H, Lan F. Inhibition of ADP Induced Platelet Aggregation by Clopidogrel is Related to CYP2C19 Genetic Polymorphism. *Clin Exp Pharma Physiol* 2008; 35: 904–908.

<sup>34</sup> Collet JP, Hulot JS, Pena A, Villard E, Esteve JB, Silvain J. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 2009; 373: 309–17.

---

<sup>35</sup>Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus JC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Philips JR, Sato R, Waterman MR. The P-450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987; 6: 1-11.

<sup>36</sup> Rudez G, Bouman HJ, van Werkum JW, Leebeek FW, Kruit A, Ruven HJ, ten Berg JM, de Maat MP, Hackeng CM. Common variation in the platelet receptor P2RY12 gene is associated with residual on-clopidogrel platelet reactivity in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 515-21.

<sup>37</sup>Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P-450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 342-349.

<sup>38</sup>Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 481-94.

<sup>39</sup>Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, Carlson EJ, Taylor TR, de la Cruz M, et al. Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5896-901.

<sup>40</sup>Inoue K, Yamazaki H, Shimada T. Linkage between the distribution of mutations in the CYP2C18 and CYP2C19 genes in the Japanese and Caucasian. *Xenobiotica* 1998; 28: 403-411.

<sup>41</sup>Dorado P, Suarez-Kurtz G, Llerena A. Pharmacogenetics of cytochrome p450 in Hispanic populations. 2007; cap 5: Pag 6.

---

<sup>42</sup> <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>

<sup>43</sup> Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci* 2003; 28: 307–317.

<sup>44</sup> Wiviott SD, Dietmar T, Frelinger AL, O'Donoghue M, Neumann FJ, Michelson AD, 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: 2923-32.

<sup>45</sup> Lahiri DK and Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of MW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.

<sup>46</sup> Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; 6: 986-994.

<sup>47</sup> Giasuddin ASM. Polymerase Chain Reaction Technique: Fundamental Aspects and Applications in Clinical Diagnostics. *IAS* 1995; 8: 29-32.

<sup>48</sup> McDowell D. The polymerase chain reaction patents: going, going, . . . still going. *J R Soc Med* 2006; 99: 62–64.

<sup>49</sup> The Nuremberg Code [from Trials of War Criminals before the Nuremberg Military Tribunals under Control Council Law No. 10. Nuremberg, October 1946–April 1949. Washington, D.C.: U.S. G.P.O, 1949–1953.]



---

<sup>50</sup> <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>

<sup>51</sup> Kassimis G, Stavrou EF, Alexopoulos D, Athanassiadou A. Cytochrome P450 2C19 Polymorphisms and Antiplatelet Therapy. Who should really be Genotyped?. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 2489-95.

<sup>52</sup> Rudez G, Bouman HJ, van Werkum JW, Leebeek FW, Kruit A, Ruven HJ, ten Berg JM, de Maat MP, Hackeng CM. Common variation in the platelet receptor P2RY12 gene is associated with residual on-clopidogrel platelet reactivity in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 515-21.

<sup>53</sup> Śpiewak M, Małek LA, Kostrzewa G, Kisiel B, Serafin A, Filipiak KJ, et al. Influence of C3435T multidrug resistance gene-1 (MDR-1) polymorphism on platelet reactivity and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Kardiol Pol* 2009; 67: 827-34.

<sup>54</sup> Wang XD, Zhang DF, Liu XB, Lai Y, Qi WG, Luo Y, et al. Modified clopidogrel loading dose according to platelet reactivity monitoring in patients carrying ABCB1 variant alleles in patients with clopidogrel resistance. *Eur J Intern Med* 2012;23: 48–53.

<sup>55</sup> Taubert D, Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 486-501.

- 
- <sup>56</sup> Vyas A, El Accaoui R, Blevins A, Karrowni W. Outcome comparison of 600 mg versus 300 mg loading dose of clopidogrel for patients with ST-elevation myocardial infarction: a meta-analysis. *Postgrad Med* 2014; 126: 176-86.
- <sup>57</sup> Vargas-Alarcón G, Ramírez-Bello J, De la Peña-Díaz A, Calderón-Cruz B, Peña-Duque MA, Martínez-Ríos MA, et al. Distribution of ABCB1, CYP3A5, CYP2C19, and P2RY12 gene polymorphisms in a Mexican Mestizos population. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 7023–29.
- <sup>58</sup> Isordia-Salas I, Olalde-Román M, Santiago-Germán D, Corona de la Peña N, Valencia-Sánchez JS. The impact of CYP3A5\*1/\*3, PIA1/A2 and T744C polymorphisms on clopidogrel and acetylsalicylic acid response variability in Mexican population. *Thromb Res* 2012; 130: e67–72.
- <sup>59</sup> Laine L, Hennekens C. Proton Pump Inhibitor and Clopidogrel Interaction: Fact or Fiction?. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 34–41.
- <sup>60</sup> Chow CK, Moayyedi P, Devereaux PJ. Is it safe to use a proton pump inhibitor with clopidogrel?. *Pol Arch Med Wewn* 2009; 119: 564-8.
- <sup>61</sup> Polasek TM, Doogue MP, Miners JO. Metabolic activation of clopidogrel: in vitro data provide conflicting evidence for the contributions of CYP2C19 and PON1. *Ther Adv Drug Saf* 2011; 2: 253-61.
- <sup>62</sup> Nagashima Z, Tsukahara K, Morita S, Endo T, Sugano T, Hibi K, Himeno H, Fukui K, Umemura S, Kimura K. Platelet reactivity in the early and late phases of acute coronary syndromes according to cytochrome P450 2C19 phenotypes. *Cardiol* 2013; 62: 158-64.