



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Programa Oficial de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

TESIS DOCTORAL

**RESULTADOS DE LA TERAPIA ANTIAGREGANTE
GUIADA POR GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS EN
LOS GENES *CYP2C19* Y *ABCB1* EN PACIENTES SOMETIDOS
A INTERVENCIÓN CORONARIA PERCUTÁNEA CON STENT**

JESÚS GABRIEL SÁNCHEZ RAMOS

DIRECTORES

Dra. CRISTINA LUCÍA DÁVILA FAJARDO
PROF. Dr. JOSÉ ANTONIO RAMÍREZ HERNÁNDEZ

Granada, Marzo 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Jesús Gabriel Sánchez Ramos
ISBN: 978-84-9163-230-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/46938>



UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE MEDICINA

El doctorando Jesús Gabriel Sánchez Ramos y los directores de la tesis Cristina Lucía Dávila Fajardo y José Antonio Ramírez Hernández, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 24 de Marzo de 2017

Directores de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Cristina Lucía Dávila Fajardo

Fdo.: Jesús Gabriel Sánchez Ramos

Fdo.: José Antonio Ramírez Hernández

El proyecto del estudio que constituye esta tesis fue galardonado con el Premio Especial en Medicina Personalizada en la VII Edición de los premios Best in Class 2012, y fue financiado en la Convocatoria de la Consejería de Salud y Bienestar Social de la Junta de Andalucía en el año 2012. Subvención: PI-057/2012.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados como Artículos Científicos en dos revistas internacionales:

1.- "International Journal of Cardiology" con la siguiente referencia:

Sánchez-Ramos J, Dávila-Fajardo CL, Toledo Frías P, Díaz Villamarín X, Martínez-González LJ, Martínez Huertas S, et al. Results of genotype-guided antiplatelet therapy in patients who undergone percutaneous coronary intervention with stent. *Int J Cardiol.* 2016 Dec 15; 225: 289-95.

2.- "Data in Brief" con la siguiente referencia:

Davila-Fajardo CL, Sanchez-Ramos J, Villamarin XD, Martinez-Gonzalez LJ, Frias PT, Huertas SM, et al. The study protocol for a non-randomized controlled clinical trial using a genotype-guided strategy in a dataset of patients who undergone percutaneous coronary intervention with stent. *Data Brief.* 2017 Feb; 10: 518-24.

Igualmente se han presentado como comunicaciones orales a tres congresos nacionales y uno internacional:

1.- Congreso de la Sociedad Europea de Cardiología 2016: Results of genotype guided antiplatelet therapy in patients undergone percutaneous coronary intervention with stent.

Autores: J G. Sánchez Ramos, CL. Dávila Fajardo, P. Toledo Frias, X. Díaz Villamarín, LJ. Martínez-González, S. Martínez Huertas, F. Burillo Gómez, J. Caballero Borrego, A. Bautista Pavés, MC. Marín Guzmán, JA. Ramírez Hernández, C. Correa Vilches, J. Cabeza Barrera.

2.- Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares de la Sociedad Española de cardiología 2012. Influencia de los polimorfismos cyp2c19 y abcb1 en el tratamiento antiagregante con clopidogrel.

Autores: Jesús Gabriel Sánchez Ramos, Pablo Toledo Frías, Susana Martinez Huertas, Francisco Burillo Gómez, Cristina Lucia Davila Fajardo, Alicia Bautista Pavés, Juan Caballero Borrego y Concepción Correa Vilches.

3.- Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares de la Sociedad Española de cardiología 2015: Resultados del uso de la farmacogenética en la elección del tratamiento antiagregante plaquetario tras intervención coronaria percutánea con stent.

Autores: Jesús Gabriel Sánchez Ramos, Cristina Lucía Dávila Fajardo, Francisco Burillo Gómez, Pablo Toledo Frías, Susana Martínez Huertas, Xando Díaz Villamarín. Juan Caballero Borrego, Alicia Bautista Pavés y Concepción Correa Vilches.

4.- Congreso de las Enfermedades Cardiovasculares de la Sociedad Española de cardiología 2016: Resultados cardiovasculares de prasugrel como alternativa a clopidogrel en las variantes genéticas CYP2C19 Y ABCB1.

Autores: J G Sánchez Ramos, Cristina Lucía Dávila Fajardo, Susana Martínez Huertas¹, Eduardo Moreno Escobar, M. Pilar Martín De La Fuente, Luis Javier Martínez González, Xando Díaz Villamarín y Concepción Correa Vilches.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Concha Correa Vilches, jefa de la UCG de Cardiología, por su confianza en mí para llevar a cabo proyectos tan ilusionantes como el que culmina con la presentación de esta tesis, por haberme apoyado en todo momento, por su motivación constante, su ilusión y optimismo inagotable.

Al Dr José Cabeza Barrera, jefe de la UCG de Farmacia, por haberme hecho participe de su equipo y por su generosidad en compartir conmigo este trabajo.

A la Dra Cristina Dávila, mi directora de tesis, por su ayuda y entrega infinita e incuantificable en el desarrollo de esta tesis, fruto de su experiencia y conocimientos en el campo de la farmacogenética, pero sobretodo de su pasión por la investigación y la ciencia. Gracias por tu empatía y paciencia conmigo.

Al Dr José Antonio Ramírez, codirector de tesis, por su amabilidad, disponibilidad y sabio consejo en la culminación de esta tesis.

A todos mis compañeros de trabajo del Servicio de Cardiología del Hospital San Cecilio, especialmente a los facultativos Pablo Toledo, Francisco Burillo, Susana Martínez, Alicia Bautista y Juan Caballero, por su esfuerzo y colaboración en la realización de este trabajo.

A los facultativos del Servicio de Farmacia del Hospital San Cecilio, y en particular, a Xando Díaz Villamartín por su contribución y ayuda inestimable en la recogida de muestras y en el análisis de historias clínicas.

A los profesionales de Genyo, Luis Javier Martínez, Belén Martínez, Gema García Rodríguez y Antonio Gómez Martín por su excelente asistencia técnica en el procesamiento genético de las muestras y por su aportación a esta tesis en lo relativo a la técnica del genotipado.

A todos los pacientes que han participado, por aceptar amablemente su participación y colaboración.

Por último, agradecer a mi familia por ser el pilar fundamental de mi vida:

A mis padres por la educación que con esfuerzo me dieron y por su ayuda que desde el cielo aún siento; a ellos debo cuanto soy.

A mis hermanos por el ejemplo, cariño y mutua admiración que nos procesamos.

A mi esposa por estar a mi lado apoyándome siempre, y a mis hijos, para que vean en mí un ejemplo de constancia y esfuerzo por conseguir sus metas.

TESIS DOCTORAL

**“RESULTADOS DE LA TERAPIA ANTIAGREGANTE
GUIADA POR GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS EN
LOS GENES *CYP2C19* Y *ABCB1* EN PACIENTES SOMETIDOS
INTERVENCIÓN CORONARIA PERCUTÁNEA CON STENT”**



JESÚS GABRIEL SÁNCHEZ RAMOS

DIRECTORES

Dra. CRISTINA LUCÍA DÁVILA FAJARDO
PROF. Dr. JOSÉ ANTONIO RAMÍREZ HERNÁNDEZ

Granada, Marzo 2017

RESUMEN ESTRUCTURADO

Título: Resultados de la terapia antiagregante guiada por genotipado de los polimorfismos en los genes *CYP2C19* y *ABCB1* en pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea con stent

Introducción: Clopidogrel ha demostrado efectos beneficiosos en el síndrome coronario agudo y en la intervención coronaria percutánea, sin embargo, diferentes polimorfismos genéticos reducen su eficacia. El objetivo de este estudio fue comprobar si una estrategia de guiar el tratamiento antiagregante en base a los genotipos *CYP2C19* / *ABCB1* reduce la tasa de eventos cardiovasculares y sangrado.

Método: Estudio experimental no randomizado que incluyó pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea con stent. Una estrategia prospectiva guiada por genotipo (grupo de intervención) se comparó con una estrategia retrospectiva no guiada (grupo control). El objetivo principal de eficacia fue el compuesto de muerte cardiovascular, síndrome coronario agudo y/o accidente cerebrovascular durante 12 meses después de la intervención. El objetivo secundario fue comparar la eficacia de las diferentes terapias antiagregantes utilizadas en condiciones de genotipado.

Resultados: El estudio incluyó a 719 pacientes intervenidos con stent, más del 86% con síndrome coronario agudo. El objetivo primario se produjo en 32 pacientes (10,1%) en el grupo de genotipado y en 59 pacientes (14,1%) en el grupo control (HR 0,63; IC 95%: 0,41-0,97; p = 0,037). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en las hemorragias mayores y

menores (4,1% vs. 4,7%, HR = 0,80; IC del 95%: 0,39-1,63; p=0,55). En el grupo de intervención, el 59% de los pacientes no portaban genotipo de riesgo y recibieron clopidogrel; el otro 41% eran portadores, y fueron tratados con los nuevos antiagregantes. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratados con clopidogrel en comparación con los nuevos antiagregantes ni en la tasa de eventos (9,1% vs 11,5% p = 0,44), ni en sangrados (3,7% frente a 4,6%, p = 0,69).

Conclusiones: La estrategia de selección del fármaco antiagregante guiada por genotipo reduce la tasa de eventos cardiovasculares y hemorragias durante 12 meses después de la intervención coronaria percutánea en comparación con una estrategia no guiada.

Palabras clave: Clopidogrel, tratamiento antiagregante guiado por genotipado, CYP2C19, ABCB1

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	La Cardiopatía Isquémica Crónica y el SCA.....	1
1.2	Papel de las plaquetas	5
1.3	Los antiagregantes plaquetarios orales.....	7
1.3.1	Antiagregantes clásicos: AAS, Ticlopidina y Clopidogrel	9
1.3.2	Resistencia a clopidogrel.....	14
1.3.2.1	Componente genético: los polimorfismos.	15
1.3.2.2	Evidencia clínica de los polimorfismos <i>CYP2C19</i> y <i>ABCB1</i>	21
1.3.3	Nuevos antiagregantes: Prasugrel y Ticagrelor.....	28
1.4	Estrategias de elección del tratamiento antiagregante.....	33
1.4.1	Uso de dosis altas de AAS o clopidogrel.....	37
1.4.2	Estrategia “personalizada” guiada por test de agregación.....	39
1.4.2.1	Ajuste de dosis de Clopidogrel.....	39
1.4.2.2	Cambiar a un inhibidor P2Y12 más potente.....	41
1.4.3	Estrategia personalizada por genotipado <i>CYP2C19</i> y <i>ABCB1</i>	42
1.4.3.1	Subestudio genético del ensayo TRITON-TIMI 38	43
1.4.3.2	Subestudio genético del ensayo PLATO.....	45
1.4.3.3	Evidencias previas de tratamientos guiados por farmacogenética:	46
1.4.3.4	Estudio de coste-eficacia con farmacogenética.	47
1.5	Justificación del estudio	48
2	HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	53
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
3.1	Diseño del estudio.....	57
3.2	Población de estudio	58
3.2.1	Criterios de inclusión:	58
3.2.2	Criterios de exclusión:	58
3.2.3	Tamaño de la muestra, muestreo y marco del estudio	60
3.3	Definición de la Intervención.....	61
3.4	Procedimientos del estudio y seguimiento: protocolo del estudio.....	62

3.5	Variables del estudio.....	64
3.6	Genotipado <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i> y <i>ABCB1</i> : Recogida y tratamiento de la muestra biológica.	67
3.7	Análisis estadístico.	69
3.8	Aspectos éticos de la investigación:	71
4	RESULTADOS.....	75
4.1	Pacientes y tratamiento	75
4.2	Características basales.	76
4.3	Tratamiento antiagregante.....	80
4.4	Evaluación clínica genotipado frente a no genotipado	81
4.5	Evaluación clínica dentro del grupo genotipado.....	86
4.6	Frecuencias genotípicas <i>CYP2C19*2</i> , <i>CYP2C19*3</i> and <i>ABCB1</i>	88
5	DISCUSIÓN	95
5.1	Principios, relaciones y generalizaciones que los resultados indican.	95
5.2	Consecuencias teóricas del trabajo y sus posibles aplicaciones prácticas.	97
5.3	Excepciones o faltas de correlación y aspectos no resueltos	99
5.4	Nuestros resultados e interpretaciones con los trabajos de investigación previos de otros autores	103
5.5	Limitaciones del estudio.....	108
6	CONCLUSIONES	111
7	BIBLIOGRAFIA.....	117
8	ANEXOS.....	143
8.1	ANEXO I- Procedimiento del genotipado	143
8.2	ANEXO II- Hoja de consentimiento informado	158
8.3	ANEXO III - Algoritmo de elección del tratamiento antagonista P2Y12 ..	161
8.4	ANEXO IV- Evaluación favorable del comité de ética.....	163

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. El espectro de los síndromes coronarios agudos.	3
Figura 2. Hemostasia fisiológica: papel de las plaquetas.	6
Figura 3. Sitios de acción de los antiagregantes plaquetario.....	8
Figura 4. Polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs).....	18
Figura 5. Proteínas con polimorfismos implicadas en la actividad del clopidogrel.	19
Figura 6. Tasas de eventos y hemorragias con clopidogrel y los nuevos antiagregantes.....	34
Figura 7. Regimen antiagregante óptimo: balance entre seguridad y eficacia	35
Figura 8. Diseño del estudio	57
Figura 9. Circuito del estudio	64
Figura 10. Perfil del estudio.....	76
Figura 11. Supervivencia Kaplan-Meier para la variable principal de eficacia.....	81
Figura 12. Análisis multivariante para predictores de la variable principal	82
Figura 13. Porcentaje de hemorragias TIMI no relacionadas con cirugía de by-pass coronario.....	84
Figura 14. Supervivencia Kaplan-Meier para el efecto neto variables de eficacia y seguridad.....	86
Figura 15. Supervivencia Kaplan-Meier de la variable principal de eficacia en condiciones de genotipado.....	87
Figura 16. Supervivencia Kaplan-Meier para la variable de seguridad en condiciones de genotipado.....	88
Figura 17. Distribución de frecuencias genotípicas y eventos por subtipos CYP2C19 y ABCB1 combinados	90

Figura 18. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos CYP2C19 y ABCB1 en diferentes poblaciones.....91

Figura 19. Factores que influyen en el nivel de agregación plaquetaria 103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de estudios observacionales incluidos en la revisión	22
Tabla 2. Principales meta-análisis incluidos en la revisión	23
Tabla 3. Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los inhibidores P2Y12	29
Tabla 4. Características "clínicas" basales de pacientes por grupos	77
Tabla 5. Características "terapéuticas" basales de pacientes por grupos	79
Tabla 6. Asociación de los grupos con los objetivos primario y secundarios	83
Tabla 7. Hemorragias TIMI no relacionadas con CABG por grupos	85

ABREVIATURAS

AAS: ácido acetil salicílico

ACV: accidente cerebrovascular

ADP: adenosina difosfato

AE: angina estable

AI: angina inestable

ARAI: antagonistas del receptor de angiotensina II

CABG: cirugía de revascularización coronaria

CRUSADE: Can Rapid risk stratification of Unstable angina patients Suppress ADverse outcomes with Early implementation of the ACC/AHA guidelines (escala de riesgo hemorrágico)

CV: cardiovascular

EC: enfermedad coronaria

ECG: electrocardiograma

EMA: European Medicines Agency (Agencia Europea del medicamento)

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos)

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo

GENYO: Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica

GRACE: escala de riesgo isquémico (the Global Registry of Acute Coronary Events)

GWAS: Genome-wide association study

HPR: reactividad plaquetaria elevada

HR: hazard ratio

HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg

IAMCEST: infarto agudo de miocardio con elevación del ST

IAMSEST: infarto agudo de miocardio sin elevación del ST

IBP: inhibidores de la bomba de protones

IC: intervalo de confianza

ICP: intervención coronaria percutánea

IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

IMC: índice de masa corporal

INE: Instituto Nacional de Estadística

IR: Insuficiencia renal.

LIC: límite inferior del intervalo de confianza

LOF: loss of function (pérdida de función)

MACE: Major adverse cardiac events (Eventos cardiovasculares mayores)

MDR1: Multi-drug resistance gene (gen de resistencia a múltiples fármacos)

mm: milímetros

PAR-1: proteasa activada por receptor-1

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RR: riesgo relativo

SCA: síndrome coronario agudo

SNPs: single nucleotide polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido)

TIMI: Thrombolysis in Myocardial Infarction

TS: trombosis de stent

TXA2: tromboxano A2

UC: unidad coronaria

UIC: límite superior del intervalo de confianza



INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

La terapia antiplaquetaria dual con ácido acetilsalicílico (AAS) y Clopidogrel ha sido durante más de una década el cuidado estándar para los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) o aquellos con enfermedad coronaria estable que eran sometidos a una intervención coronaria percutánea (ICP) electiva.

El conocimiento de la respuesta variable al clopidogrel que determina en algunos pacientes un efecto antiagregante insuficiente con aumento del riesgo de eventos, junto a la aparición de nuevos fármacos antiagregantes inhibidores del receptor P2Y₁₂ más potentes (prasugrel y ticagrelor) que han demostrado una reducción de eventos cardiovasculares, han erigido a estos últimos como la estrategia recomendada frente a clopidogrel, al menos en el contexto del SCA (1).

Sin embargo, el aumento de las hemorragias que conllevan estos nuevos tratamientos, el incremento del coste que suponen, junto a la evidencia de que clopidogrel en ausencia de determinados polimorfismos genéticos puede ser igual de eficaz, nos hace plantearnos si la elección del tratamiento antiagregante más adecuado para cada paciente debería ser personalizada y guiada en base a sus características genéticas.

1.1 La Cardiopatía Isquémica Crónica y el SCA

La enfermedad cardiovascular sigue siendo la primera causa de mortalidad en los países desarrollados principalmente por la enfermedad coronaria y

cerebrovascular: según datos del Instituto Nacional de Estadística en 2014 ambas fueron responsables del 30% de las causas de muerte en España (2). El responsable fisiopatológico fundamental de la enfermedad cardiovascular es la *aterotrombosis*, proceso sistémico en el que los lípidos se acumulan en las paredes de los vasos sanguíneos, desarrollan gradualmente placas que estrechan la luz y alteran el flujo sanguíneo. Los estudios de autopsia y de ultrasonido han demostrado que estas placas ateroscleróticas están ampliamente distribuidas a lo largo de los vasos sanguíneos del cuerpo y se vuelven patológicas en determinadas condiciones médicas (3).

En pacientes con enfermedad coronaria, estas placas están situadas de forma difusa a lo largo de las arterias coronarias y se componen de un núcleo rico en lípidos y una cubierta esclerótica rica en colágeno. El núcleo se compone principalmente de colesterol y, normalmente, no está expuesto al flujo de sangre. Cuando crecen y disminuye la luz del vaso provocan una reducción del aporte sanguíneo con el esfuerzo lo que condiciona la angina crónica estable que los pacientes a menudo describen como presión en el pecho, resquemor, saciedad o dolor. Este malestar también puede irradiarse al cuello, la mandíbula, los hombros, la espalda o el brazo. Suele provocarse con el esfuerzo y cede con el reposo.

Sin embargo, cuando una placa se desestabiliza y se rompe, los componentes lipídicos se exponen a la sangre y determina la formación de un trombo dentro de la luz del vaso (4). La trombosis luminal puede obstruir el flujo de sangre de forma total o parcial y da lugar a un SCA con síntomas similares a la angina, aunque generalmente en reposo y de duración más prolongada. Junto con

síntomas de dolor en el pecho, el diagnóstico de SCA se basa en los cambios en el electrocardiograma (ECG) y la presencia de biomarcadores (creatina quinasa -MB y troponinas) en la sangre que indican daño del músculo cardíaco.

Por tanto, el SCA es un término amplio que describe el espectro de síntomas clínicos que reflejan la isquemia miocárdica aguda o la reducción del suministro de sangre al miocardio. Se clasifica como: infarto agudo de miocardio con elevación del ST (IAMCEST) o sin elevación del ST (IAMSEST) en base a cambios en el ECG y la elevación de biomarcadores (5), o como Angina Inestable (AI) en ausencia de biomarcadores. En última instancia la presentación clínica y el resultado dependerán de la severidad y la duración de la isquemia del miocardio generado por la trombosis del vaso culpable (13). Figura 1

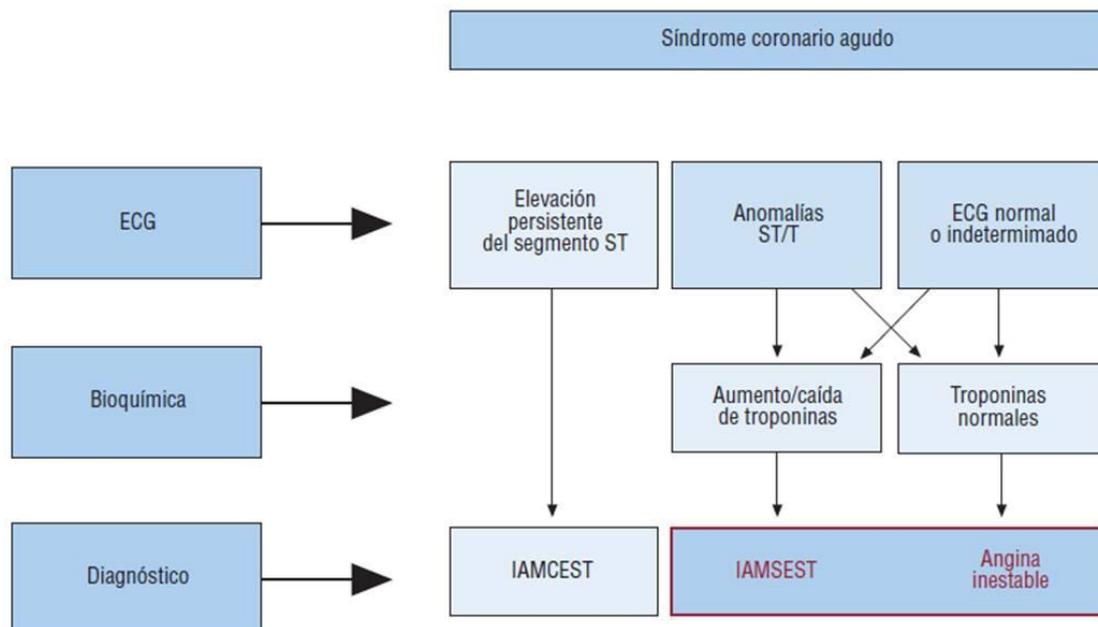


Figura 1. El espectro de los síndromes coronarios agudos (13).

La revascularización urgente se reconoce ahora como la piedra angular de manejo de los SCA. El flujo de sangre a través de un vaso sanguíneo estrecho u obstruido se puede restaurar, ya sea con cirugía de revascularización coronaria (CABG) o, más comúnmente ahora, con los procedimiento de ICP. La ICP se realiza en un 60 a 70% de los pacientes con SCA que se someten a una angiografía coronaria diagnóstica (6). En los pacientes con SCA la ICP reduce la mortalidad, el infarto, el derrame cerebral, la isquemia recurrente y la hospitalización en comparación con las estrategias de manejo médico conservador (7-9). Igualmente en los pacientes con angina crónica la revascularización está indicada cuando hay refractariedad a la terapia médica optimizada, o como tratamiento de primera línea en situaciones de riesgo como la isquemia extensa, enfermedad multivaso y la disfunción ventricular (10).

En los últimos años se han producido importantes avances en las técnicas de los procedimientos, equipos y dispositivos. La introducción de los stents liberadores de fármacos, en comparación con los stents convencionales, ha reducido la necesidad de revascularización del vaso diana (11). Sin embargo, estos procedimientos y los dispositivos, junto con un estado de hiperactividad persistente de las plaquetas asociado con los SCA y la propia ICP, da lugar a que los pacientes mantengan un riesgo adicional de eventos isquémicos que se extiende mucho después de la estabilización clínica y el alta hospitalaria.

Para combatir esto, el uso de la terapia antiplaquetaria doble con mecanismos de acción complementarios (durante más de una década el tratamiento estándar de AAS y clopidogrel) es ahora una estrategia bien

establecida para mejorar los resultados de los procedimientos intervencionistas tanto a corto plazo en el hospital como a largo plazo para la prevención de eventos cardiovasculares secundarios (12, 13).

Junto al control de los factores de riesgo, los tratamientos basados en la evidencia científica han conseguido disminuir la tasa de mortalidad coronaria en España en un 40% desde 1990 (14). Sin embargo, la tasa de eventos graves tras un ingreso por SCA sigue siendo alta (mortalidad global al año del 15%) (15). Por todo ello se han producido mejoras en la terapia antitrombótica y dentro de esta, en la terapia antiagregante.

1.2 Papel de las plaquetas

Las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la hemostasia y son clave para la reparación fisiológica de los vasos sanguíneos. Sin embargo, también tienen un papel destacado en el desarrollo de los SCA y los accidentes cerebrovasculares (ACV) (16). Figura 2.

Las plaquetas se producen en la médula ósea y son liberadas al torrente sanguíneo, donde normalmente circulan en un estado de reposo en forma de disco. La plaqueta madura tiene una vida útil esperada de 7-10 días. En respuesta a una lesión, las plaquetas se adhieren, se activan, y se agregan unas con otras, produciendo un trombo. La generación de un trombo dependiente de plaquetas requiere 3 etapas: (1) la adhesión de plaquetas; (2) la activación, el reclutamiento adicional, y la agregación de las plaquetas; y (3) la estabilización del trombo(17).

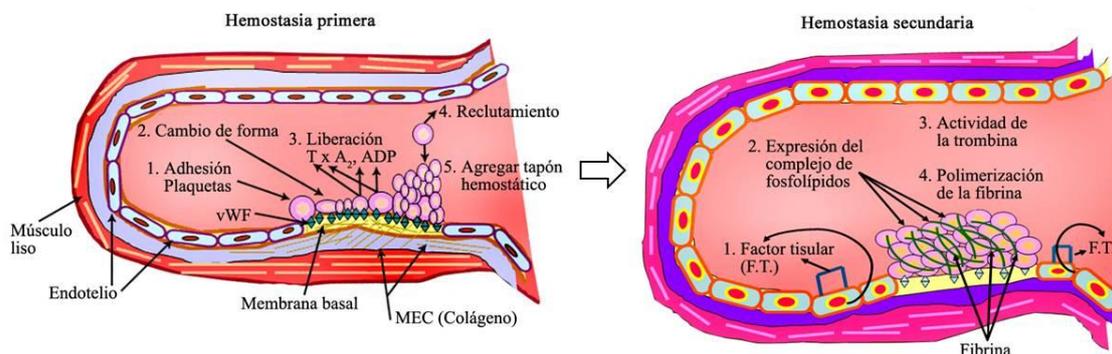


Figura 2. Hemostasia fisiológica: papel de las plaquetas (17).

Las plaquetas se adhieren sobre la pared del vaso dañado para formar una monocapa de plaquetas, resultado de la interacción de los receptores de la glicoproteína (GP) en la superficie de las plaquetas con el factor de von Willebrand, una proteína de plasma circulante, y el colágeno en el sitio de la lesión vascular. La activación plaquetaria se produce a través de los receptores de la adenosina difosfato (ADP) en la superficie de las plaquetas, denominados P2Y1 y P2Y12. La unión del ADP al receptor P2Y1 da como resultado un cambio de forma de las plaquetas y la agregación de plaquetas rápida y reversible. La unión del ADP al receptor P2Y12 provoca la liberación de gránulos de almacenamiento de las plaquetas que contienen ADP, tromboxano A₂ (TXA₂), y otros factores. Esto sirve no sólo para reclutar y activar plaquetas adicionales, sino también para amplificar la agregación plaquetaria inducida por otros agentes, incluyendo trombina, serotonina y TXA₂. Estas sustancias sirven para aumentar la inflamación, atraer otros mediadores a la zona local y mejorar las propiedades adhesivas de la pared del vaso. Y lo más importante, esta actividad procoagulante de las plaquetas

activan el receptor GPIIb/IIIa en la superficie de las plaquetas. En la etapa final, las plaquetas activadas se conectan unas con otras, tendiendo puentes a través de los receptores GPIIb/IIIa y fibrinógeno, con lo que se estabiliza el trombo.

Estos procesos hemostáticos de activación plaquetaria y formación de trombos posterior evitan las hemorragias tras la rotura de un vaso. Sin embargo, cuando ocurren en el interior del vaso, en el sitio de ruptura de una placa, provocan obstrucción del flujo sanguíneo, isquemia e infarto distal a la obstrucción. Cuando este vaso es una arteria coronaria tiene lugar el desarrollo de un SCA (16).

1.3 Los antiagregantes plaquetarios orales

Los antiagregantes plaquetarios interfieren con el proceso de activación mediante el bloqueo selectivo de receptores o enzimas de las plaquetas, lo que reduce el riesgo de trombosis arterial (efectividad) por medio de mecanismos que no pueden ser disociados de un mayor riesgo de complicaciones hemorrágicas (toxicidad).

Actualmente los agentes antiagregantes orales disponibles incluyen el AAS, un inhibidor irreversible de la ciclo-oxigenasa 1 (COX-1) que impide la síntesis de TXA₂, y los fármacos antagonistas P2Y₁₂ (Ticlopidina, Clopidogrel, Prasugrel y Ticagrelor), que de forma selectiva se unen al receptor P2Y₁₂ del ADP. Tanto el AAS como los antagonistas P2Y₁₂ han demostrado beneficios en pacientes con enfermedad aterotrombótica. Además, en determinados escenarios como el SCA y

la ICP, la combinación de AAS más un antagonista del receptor P2Y₁₂ (terapia antiplaquetaria dual) ha demostrado mayor eficacia frente a la monoterapia con cualquiera de estos agentes (6, 18-21).

Otros agentes antiagregantes nuevos se están evaluando en estudios preclínicos y / o clínicos: elinogrel un nuevo antagonista P2Y₁₂ más potente, los antagonistas de la proteasa activada por receptor-1 (PAR-1) (atopaxar y vorapaxar), que bloquean uno de los receptores de la trombina (22). Figura 3

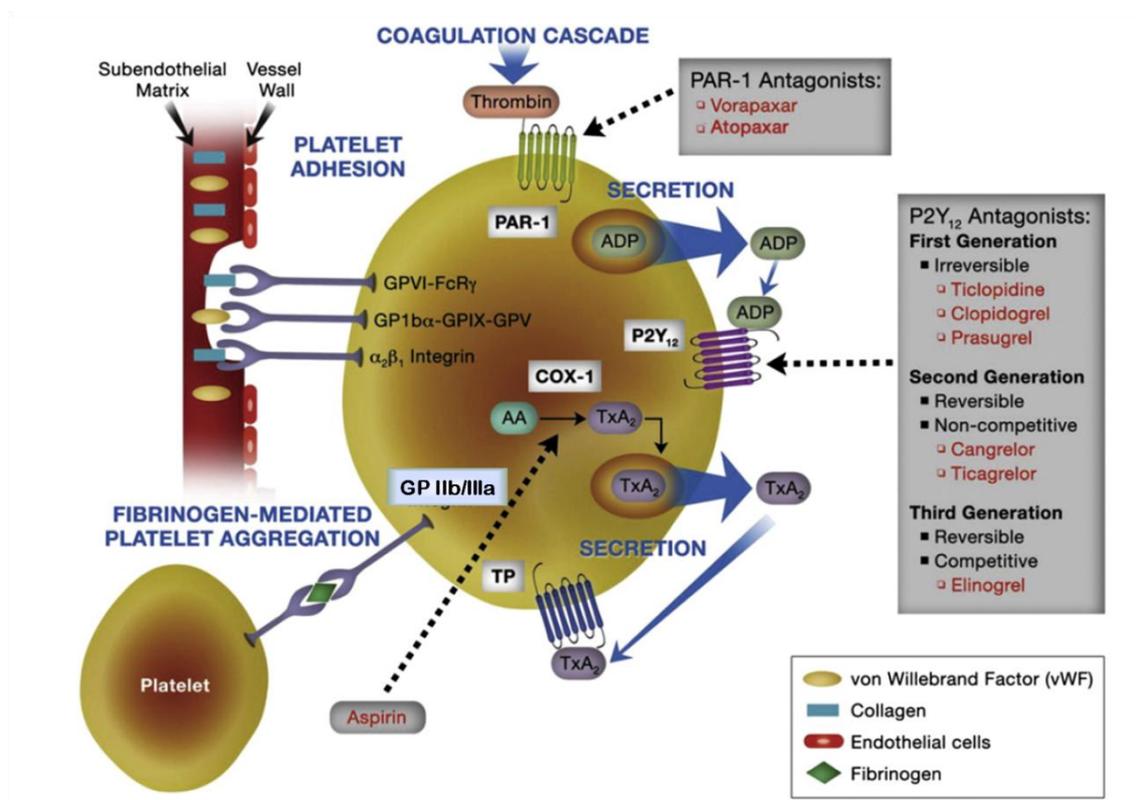


Figura 3. Sitios de acción de los antiagregantes plaquetario (22).

1.3.1 Antiagregantes clásicos: AAS, Ticlopidina y Clopidogrel

AAS: Ácido acetilsalicílico.

El AAS inhibe irreversiblemente ambas formas de la enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), reduciendo la formación de prostaglandinas y TXA₂. Las prostaglandinas proporcionan protección de lesión a la mucosa gastrointestinal. El efecto antiplaquetario irreversible dura toda la vida de la plaqueta desde dosis tan bajas como 30 mg. Dosis más elevadas se requieren para inhibir la COX-2 y producir efectos anti-inflamatorios sistémicos, con una variación de 50 a 100 veces en las dosis diarias de AAS requeridas para suprimir la inflamación e inhibir la función plaquetaria (23).

En los pacientes con enfermedad cardiovascular, el AAS reduce eficazmente el riesgo de episodios recurrentes, prevención secundaria, en aproximadamente un 30% (18, 24). En pacientes con IAM, el tratamiento con AAS redujo el riesgo relativo de infarto no fatal en un 28%, muerte cardiovascular en un 15 %, y la mortalidad global en un 11%. El AAS es eficaz en una amplia gama de dosis, desde 75 hasta 325 mg diarios. Para el tratamiento del SCA, se recomienda una dosis inicial de 150-300 mg, y luego la dosis puede reducirse entre 81 mg y 150 mg de forma indefinida (12, 13).

El AAS, sin embargo, no impide que todos los eventos trombóticos se repitan. Esto ha llevado a la identificación de pacientes con resistencia al AAS (25) y se han planteado una serie de causas potenciales, incluyendo dosis inadecuada,

las interacciones medicamentosas, la variación genética en la actividad de la enzima COX-1 y la biosíntesis de TXA2, y una mayor renovación plaquetaria. Sin embargo, la evidencia actual no soporta la utilidad pronóstica de la detección de la respuesta a AAS.

Los efectos adversos más comunes del AAS son gastrointestinales (indigestión, náuseas, ardor de estómago y estreñimiento), en general están relacionados con la dosis y puede ser minimizado mediante el uso de formulaciones con recubrimiento entérico o tomar AAS con las comidas. La hemorragia es el efecto adverso más grave de la terapia con AAS a largo plazo, aunque son poco frecuentes: la hemorragia gastrointestinal (aproximadamente 1 caso de cada 100 pacientes) y la cerebral (aproximadamente 1 caso por cada 1000 pacientes) (26, 27).

Ticlopidina:

Ticlopidina es una tienopiridina de primera generación que jugó un importante papel histórico en los pacientes sometidos a ICP e implante de stent coronario. La trombosis del stent fue una complicación frecuente inicial presente hasta en el 20% de los pacientes. Varios estudios evaluaron el uso de AAS sólo, la terapia anticoagulante, y la ticlopidina con y sin AAS (28, 29). Los resultados mostraron que la terapia antiplaquetaria redujo las complicaciones cardiovasculares (muerte, infarto de miocardio y trombosis del stent) con menos sangrado que la anticoagulación con warfarina. Por otra parte, la doble antiagregación con AAS y un antagonista del receptor P2Y12 actuaba de forma

sinérgica, con mayor reducción de eventos cardiovasculares mayores que cualquier agente sólo. Ticlopidina, sin embargo, se asoció con un trastorno sanguíneo poco frecuente pero potencialmente mortal, la púrpura trombótica trombocitopénica (30). Los estudios clínicos y el registro posterior mostró que clopidogrel fue mejor tolerado, con menos efectos secundarios, y tenía mayor eficacia (31). Por lo tanto, clopidogrel reemplazó a la ticlopidina como el régimen antiplaquetario estándar.

Clopidogrel:

El clopidogrel, una tienopiridina antagonista del receptor P2Y₁₂ para el ADP, tiene una larga historia de demostrar beneficio en pacientes con enfermedad cardiovascular. El estudio CAPRIE (Clopidogrel vs Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events) (19) comparó clopidogrel frente a AAS en pacientes con infarto de miocardio reciente, ACV isquémico o enfermedad arterial periférica sintomática con la intención de prevenir eventos cardiovasculares recurrentes. En comparación con el AAS, clopidogrel se asoció con una modesta reducción del riesgo relativo del 8,7% en el evento combinado de muerte vascular, IAM o ACV isquémico (análisis por intención de tratar). Clopidogrel también redujo el riesgo de rehospitalización por eventos isquémicos sin grandes diferencias en los eventos adversos entre los 2 tratamientos. Estos resultados apoyaron al clopidogrel como agente antiplaquetario alternativo de elección para los pacientes con intolerancia al AAS.

Cuando se administra en combinación con AAS, clopidogrel ha demostrado

una mayor eficacia frente a la monoterapia con AAS. El estudio CURE (Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events) (21) se realizó en pacientes con IAMSEST o AI. Los pacientes recibieron clopidogrel (carga de 300 mg seguida de 75 mg una vez al día) más AAS o AAS sólo. Durante 12 meses se observó una reducción del riesgo relativo del 20% en el resultado compuesto de infarto no fatal, ACV o muerte cardiovascular en pacientes tratados con clopidogrel más AAS. Por contra, hubo un aumento en la tasa de hemorragia mayor en estos pacientes (del 2,7% al 3,7% con un aumento del 27% del riesgo relativo) aunque sin diferencias en la tasa de hemorragia potencialmente mortal o ictus hemorrágico.

En el subestudio de los pacientes tratados con ICP (PCI-CURE) (32), hubo una reducción del riesgo relativo del 30% del combinado de muerte cardiovascular, IAM o revascularización urgente del vaso diana (dentro de los 30 días de la ICP), y de forma global un 31% en la mortalidad cardiovascular o IAM (antes y después de la ICP) en los pacientes que recibieron clopidogrel más AAS. No se observaron diferencias significativas en las tasas de hemorragia mayor ni en transfusiones de sangre.

Los resultados del estudio CREDO (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation) (33) apoyaron el efecto beneficioso del tratamiento con clopidogrel más AAS en el manejo a largo plazo de los pacientes sometidos a ICP programada. Al año, clopidogrel más AAS redujo el riesgo relativo de muerte, infarto de miocardio o ACV en un 27%. También proporcionó datos favorables sobre la administración de clopidogrel antes de la ICP. Los estudios COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial)(34) y CLARITY-TIMI

28 (Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 28) (35) se centraron en el manejo médico precoz del IAM en el hospital, la combinación de clopidogrel y AAS con trombolisis. En ambos estudios, clopidogrel más AAS redujo los eventos cardiovasculares adversos (combinado de muerte, IAM, ictus o vaso coronario ocluido relacionado con el IAM). Aunque los datos en el IAMCEST se limitaron al primer mes después de la fase aguda, las guías respaldaron universalmente la recomendación de AAS y clopidogrel hasta 12 meses después de un SCA, con una dosis de carga de 300 mg al inicio (que puede ser aumentado a 600 mg en pacientes tratados con una estrategia invasiva) y una dosis de mantenimiento de 75 mg / día.

Sin embargo, otros ensayos recientes de clopidogrel no mostraron beneficio. El estudio CARISMA (Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance) (36), comparó pacientes con enfermedad cardiovascular estable o pacientes asintomáticos con múltiples factores de riesgo cardiovascular. La combinación de AAS más clopidogrel no redujo los eventos cardiovasculares adversos cuando se compara con la aspirina sola y se asoció con un mayor riesgo de sangrado. CURRENT-OASIS 7 (Clopidogrel Optimal Loading Dose Usage to Reduce Recurrent Events/Optimal Antiplatelet Strategy for Interventions 7) (37) demostró que no había diferencia en los eventos cardiovasculares adversos a los 30 días entre los pacientes con SCA que recibieron clopidogrel en dosis doble frente al clopidogrel en dosis estándar. En el ensayo GRAVITAS (Gauging Responsiveness With A VerifyNow Assay – Impact on Thrombosis and Safety) (38), los pacientes con alta reactividad plaquetaria residual tras la implantación del stent, fueron tratados con clopidogrel en dosis

altas (150 mg al día) o clopidogrel en dosis estándar (75 mg diarios). El criterio de valoración combinado de muerte, IAM y trombosis del stent fue la misma (2.3%) en ambos grupos a los 6 meses.

Estos últimos estudios, junto al conocimiento de la existencia de una reactividad plaquetaria residual en algunos pacientes con aumento del riesgo de nuevos eventos, planteó la posibilidad de resistencia al clopidogrel y la búsqueda de estrategias de tratamiento alternativo para mejorar los resultados en los pacientes.

1.3.2 Resistencia a clopidogrel

Clopidogrel requiere bioactivación a nivel hepático a su metabolito activo (R130964) para inhibir la agregación plaquetaria. Existe una variabilidad individual sustancial en respuesta al clopidogrel, existiendo entre un 20-40 % de pacientes clasificados como no respondedores o resistentes al fármaco debido a su baja inhibición de la activación y agregación plaquetaria (39, 40). La reactividad plaquetaria residual en pacientes que reciben clopidogrel se asocia con un mayor riesgo de eventos cardiacos, cerebrovasculares y arteriales periféricos (41). El fenómeno de "resistencia al clopidogrel" ha dado lugar a esfuerzos por investigar las causas de la gran variabilidad (42), que pueden deberse a factores farmacocinéticos o farmacodinámicos (es decir, diferencias respectivamente en la cinética/concentración del metabolito activo o en la respuesta de las plaquetas).

En una población Amish (43) se identificaron varios factores: variables demográficas tales como el aumento de la edad y el índice de masa corporal,

comorbilidades como diabetes y dislipidemia, y otros factores que aún no se han identificado. Igualmente se comprobó que la respuesta a clopidogrel es altamente heredable, y, aunque se estimó que los factores genéticos y no genéticos “conocidos” explicarían sólo una parte de esta variabilidad, aproximadamente el 22%, demostraron que la agregación plaquetaria estimulada por ADP tiene un componente genético sustancial (43).

Igualmente, las interacciones medicamentosas pueden afectar a la eficacia de clopidogrel. Parece ser que los inhibidores de la bomba de protones (IBP) reducen el efecto antiagregante plaquetario y la eficacia de clopidogrel, aunque los ensayos no han confirmado estas interacciones clínicamente (44, 45). La FDA y la EMA emitieron una advertencia de salud pública en 2010, sobre el uso concomitante de clopidogrel y omeprazol que puede reducir significativamente la actividad antiplaquetaria de clopidogrel (46, 47), aunque no estableció restricciones para el uso de otros IBP.

1.3.2.1 Componente genético: los polimorfismos.

En los últimos años, diferentes polimorfismos genéticos se han asociado con diferencias en la respuesta a clopidogrel. Los polimorfismos son variaciones normales de la secuencia de ADN, “los diferentes alelos de un gen”, que no tienen efectos adversos en el individuo y se producen con frecuencia bastante alta en la población general (al menos en un 1%), para diferenciarla de las mutaciones (50). Algunos polimorfismos pueden traducirse en diferentes fenotipos, por ejemplo el color de los ojos, otros pueden ser marcadores de susceptibilidad a enfermedades

o de éxito/fracaso de un tratamiento farmacológico:

Un polimorfismo puede consistir en: a) La sustitución de una única base nitrogenada de una secuencia del genoma, lo que da origen a lo que se conoce como SNPs (Single Nucleotid Polymorphism o polimorfismo de un solo nucleótido), el más frecuente; b) La inserción o delección de una base en el ADN; c) La inserción o delección de un conjunto de bases, en número de cientos a miles; d) La inserción o delección, repetidas veces, de una o más bases, constituyendo los microsatélites.

La variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los SNPs. La mayoría de los SNPs están presentes en regiones no codificantes y por tanto no tienen efecto sobre el fenotipo. Sin embargo, cuando se presentan en regiones codificantes van a dar lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos. Estos cambios pueden ser: a) Silenciosos (synonymous): hay un cambio en una de las bases de forma que el triplete de nucleótidos se modifica, pero sigue codificando para el mismo aminoácido. b) En sentido equivocado (missense): El cambio en una de las bases da lugar a un triplete que codifica para un aminoácido diferente. c) Sin sentido (nonsense): el nuevo triplete que se forma determina la señal de fin de la cadena de aminoácidos.

Existen aproximadamente 10 millones de SNPs y la gran mayoría tienen dos alelos, los cuales están representados por la sustitución de una base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o “salvaje” y alelo raro o mutante, según la frecuencia en la que se observen. Debido a que los

humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente.

Los SNPs dan cuenta de alrededor el 90% de la variación del genoma humano y su uso se va extendiendo gracias al proyecto 1000 genomas (anteriormente llamado HapMap) (48, 49), que tiene como objetivo proporcionar el conjunto mínimo de SNPs necesarios para el genotipo del genoma humano.

El genotipado persigue el análisis de las variaciones individuales que existen en la secuencia genética de un ser vivo. Para realizar un genotipado se utilizan una variedad de técnicas entre las que se incluyen la PCR (para amplificar el material genético), hibridación (para discriminar secuencias homólogas), secuenciación (para determinar la secuencia genética de fragmentos genéticos más o menos largos) y el análisis informático (para realizar operaciones complejas de ensamblado, alineación y anotación genética). Se han desarrollado varias técnicas que interrogan SNPs por hibridación de sondas de ADN complementarias al sitio SNPs, que están comercializadas y fácilmente accesible. La técnica y el procedimiento del genotipado se describen más ampliamente en el Anexo I.

Cuando estos polimorfismos afectan a una proteína o enzima relacionada con la acción de un fármaco, pueden producir una respuesta alterada del mismo por diferentes mecanismos (alteración de la farmacodinámica, farmacocinética...) (50). Figura 4.

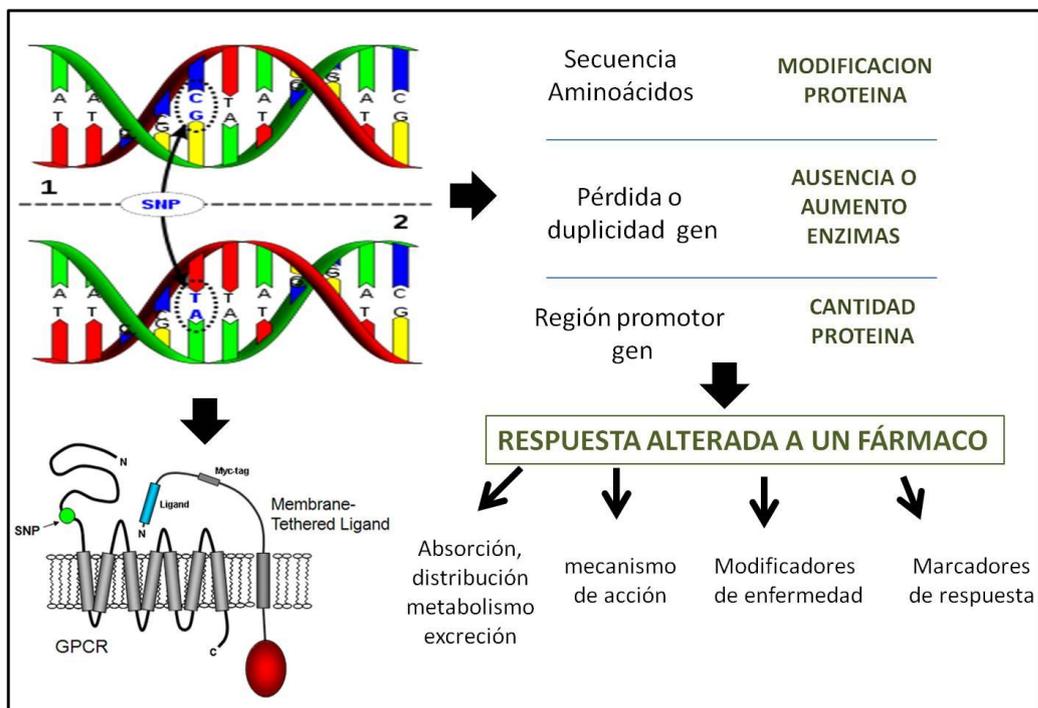


Figura 4. Polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs)

La detección y caracterización de SNPs está en la base de la llamada medicina personalizada y la farmacogenética es la ciencia que estudia el efecto de la variabilidad genética de un individuo en su respuesta a determinados fármacos. El objetivo se centra en conseguir prescribir al paciente el medicamento adecuado según su perfil genético para conseguir un buen efecto terapéutico con el menor efecto tóxico posible.

De todos los polimorfismos que afectan a proteínas relacionadas con la respuesta a clopidogrel, sólo los genes *CYP2C19* y *ABCB1*, relacionados con el metabolismo y la absorción de clopidogrel, se han mostrado como los de mayor trascendencia (51). Figura 5.

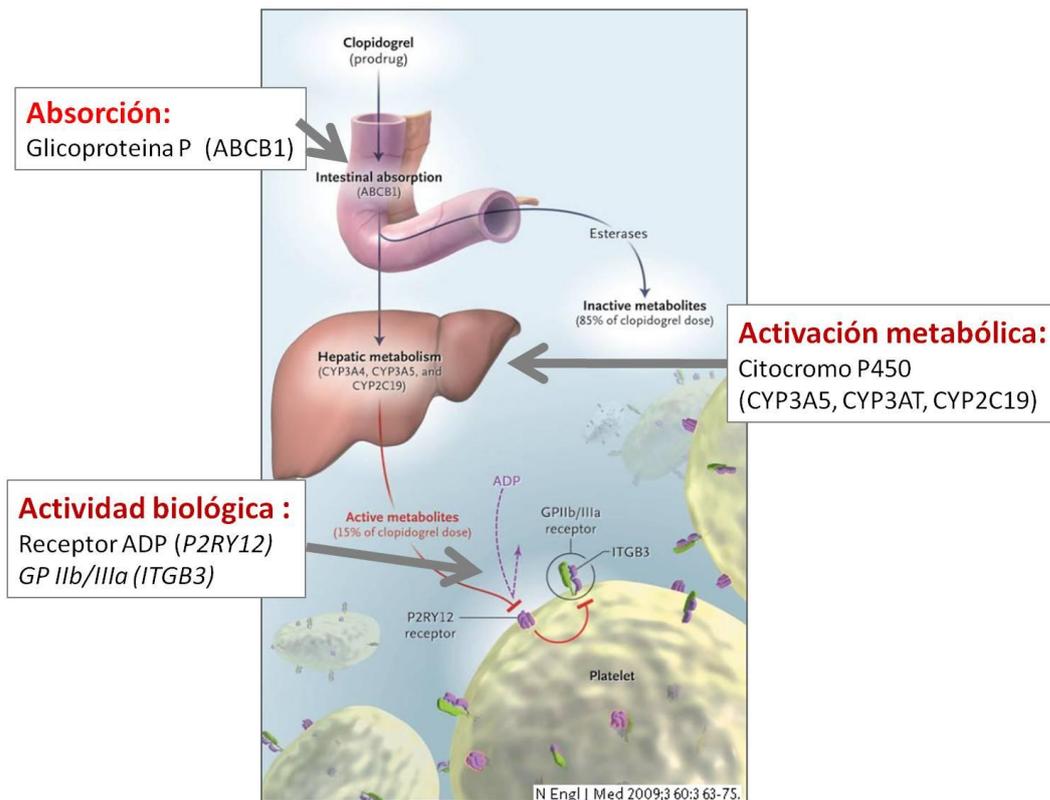


Figura 5. Proteínas con polimorfismos implicadas en la actividad del clopidogrel (51).

La *absorción intestinal* del profármaco clopidogrel está limitada por la glicoproteína P, también llamada proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MDR1), que es una bomba de “expulsión” intestinal, es decir, disminuye el paso de fármacos del intestino al torrente sanguíneo, y está codificada por el gen *ABCB1* (Fig 5). Se ha demostrado que el polimorfismo *ABCB1* C3435T (rs1045642) influye en la biodisponibilidad oral de clopidogrel y el pronóstico de los pacientes con SCA (52). La concentración plasmática máxima y el área bajo la curva de concentración plasmática de clopidogrel y de su metabolito activo fue significativamente menor entre los portadores homocigotos del alelo variante TT (alta expresión genética) en comparación con los portadores heterocigotos u homocigotos del tipo salvaje,

CT o CC (intermedia o baja expresión genética respectivamente). Posteriormente, la mayoría del profármaco, hasta el 85%, es inactivada por las esterasas en la sangre. El resto del profármaco se somete a un proceso de 2 etapas que implica múltiples enzimas del citocromo P450. En el primer paso metabólico, clopidogrel se cataliza por enzimas (CYP1A2, CYP2B6 y principalmente CYP2C19) y da lugar a un metabolito inactivo (2-oxo-clopidogrel). El segundo paso requiere 4 enzimas (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4) y produce un metabolito activo(53).

En el *metabolismo hepático*, el gen *CYP2C19* es importante en la respuesta al clopidogrel porque la conversión a su metabolito activo depende en parte de la isoenzima que codifica este gen. Los alelos con pérdida de función (LOF) en *CYP2C19*, *2 (rs4244485), *3 (rs4986893), *4 (rs28399504), *5 (rs56337013), *6 (rs72552267), *7 (rs72558186), *8 (rs41291556) se han asociado con un menor nivel de metabolito, disminución de la inhibición plaquetaria, y mayores tasas de eventos cardiovasculares, aunque sólo con trascendencia clínica la variante *CYP2C19**2, por la escasa prevalencia (<1%) del resto de variantes (54). En función de la presencia de ninguno, uno o dos alelos con LOF se clasifican a los pacientes como metabolizador normal (1/1), intermedio (1/2) o pobre (2/2) lo que determina un 26-31% de menor exposición a metabolito activo de clopidogrel en los metabolizadores intermedios y hasta del 46-55% menos en los metabolizadores pobres (54), y secundariamente, una persistencia de la agregación plaquetaria inducida por ADP tras clopidogrel del 41%, 47%, y 65% respectivamente (43)

La variante *CYP2C19**17 (rs12248560), un polimorfismo con ganancia de función, se ha asociado con un aumento de la actividad enzimática (metabolizador

ultrarápido), una menor reactividad de las plaquetas y mayor riesgo de hemorragias durante el tratamiento con clopidogrel, aunque no parece compensar la pérdida de función de los alelos LOF en *CYP2C19* (55). Los pacientes con el genotipo *CYP2C19*2/*17* persisten con un aumento de la reactividad de las plaquetas en respuesta a clopidogrel, en comparación con los pacientes con el genotipo *CYP2C19*1/*1* (56); sin embargo, más estudios son necesarios.

La prevalencia de estos polimorfismos *CYP2C19* y *ABCB1* puede variar significativamente entre diferentes grupos étnicos lo que va a determinar el impacto de las pruebas farmacogenéticas. Específicamente, los polimorfismos del gen *CYP2C19*2*, están presentes en aproximadamente el 30% de la población blanca caucásica, 40% de los negros y más del 55% de los orientales (57). En una población multirracial brasileña, las frecuencias del genotipo homocigoto *ABCB1* C3435T fueron mayores en los amerindios (27,3%) en comparación con los de raza caucásica (19,8%), mulatos (13,3%) y descendiente africanos (13,1%) (58).

1.3.2.2 Evidencia clínica de los polimorfismos *CYP2C19* y *ABCB1*

Dado la influencia de las variantes genéticas en la respuesta plaquetaria al clopidogrel, diferentes grupos han estudiado la asociación entre variantes genéticas y eventos clínicos en pacientes con enfermedad coronaria. En los pacientes de alto riesgo (como aquellos con SCA y tratados con stent) en tratamiento con clopidogrel, diversos estudios observacionales mostraron que los alelos LOF en *CYP2C19* son un factor determinante de la ocurrencia de eventos adversos cardiovasculares, y en particular, la trombosis del stent. Sin embargo, en

pacientes de bajo riesgo esta asociación ha sido menos convincente. Aunque menos artículos han estudiado la asociación entre *ABCB1* y los eventos cardiovasculares, la mayoría de ellos concluyeron que esta asociación era significativa. Todos estos estudios y diferentes meta-análisis se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Principales características de estudios observacionales incluidos en la revisión

Ref	Año	Etnia	Población	n	ICP-stent(%)	Seguimiento	Objetivos	Polimorfismo	Resultados (LOF vs no LOF)
Collet (59)	2009	Caucásica	SCA	259	86	>4 años	MACE:Muerte CV, SCA, revascularización	CYP2C19*2	HR 5.38 (2.32-12.47) p<=0.0001
							TS definite	CYP2C19*2	HR 6.04 (1.75-20.80) p=0.004
Mega (54)	2009	84% Caucásica	SCA-stent (TRITON)	1477	100	15 meses	MACE (muerte CV, SCA, ictus)	CYP2C19*2	HR 1.53 (1.07-2.19) p=0.01
							TS definido	CYP2C19*2	HR 3.09 (1.19-8.0) p=0.02
Mega (60)	2010	84% Caucásica	SCA-stent (TRITON)	2905	100	15 meses	MACE (muerte CV, SCA, ictus)	CYP2C19*2 and ABCB1	ABCB1 TT vs CT/CC: HR 1.72 (1.22-2.44) p=0.002 CYP2C19*2 + ABCB1 HR 1.97 (1.38-2.82) p=0.0002
Simon (51)	2009	Caucásica	SCA	2208	68.7	12 meses	MACE (muerte, SCA, ictus)	CYP2C19 y ABCB1	CYP2C19: HR 1.98 (1.10-3.58) ABCB1: HR 1.72 (1.20-2.47)
Sorich (61)	2010	84% Caucásica	SCA stent (TRITON)	13608	100	15 meses	MACE (muerte CV, SCA, ictus)	CYP2C19 LOF	OR 1.63 (1.45-1.81) p<0.0001
Delaney (62)	2012	Caucásica	SCA y/o ICP	693	95	1-2 años	MACE (muerte CV, SCA, revascularización, ictus)	CYP2C19*2	HR 1.54 (1.16-2.06) p=0.003
								ABCB1	HR 1.28 (1.04-1.57) p=0.018
Shuldiner (43)	2009	Caucásica	ICP	227	100	12 meses	MACE (muerte CV, SCA, revascularización, ictus)	CYP2C19*2	HR 2.42 (1.18-4.99) p=0.02
Wallentin (63)	2010	Caucásica	SCA	10285	60	12 meses	MACE (muerte CV, SCA, ictus)	CYP2C19	HR At 30 days: p=0.028
								CYP2C19 and ABCB1	HR 1.2 (1.0-1.4) p=0.047**
Bhatt (64)	2012	Caucásica	EC estable	15603	0	28 meses	MACE (muerte CV, SCA, ictus)	CYP2C19 LOF y*17	p=0.621
Pare (65)	2010	Caucásica - latino americano	SCA y FA	5059	14.5	12 meses	MACE (muerte CV, SCA, ictus)	CYP2C19*2	p=0.32
Doll (66)	2016	Multi-racial	SCA sin ICP	5736	7,9%	30 meses	MACE (muerte CV, SCA, ictus)	CYP2C19*2	HR: 1,17 (0,99-1,38) p 0,07

Tabla 2. Principales meta-análisis incluidos en la revisión

Ref	Año	Estudios incluidos	Población	n	Polimorfismo	Objetivos	Resultados (LOF vs no LOF)
Sofi (67)	2011	Trenk (68), Mega (54), Simon (51), Collet (59), Sibbing (69), Giusti (70), Suldnier (43)	EC	8043	CYP2C19*2	MACE	RR 1.96 (1.14-3.37), p=0.02
						TS	RR 3.82 (2.23-6.54) p=0.0001
Bauer (71)	2011	Trenk (68), Mega (54), Simon (51), Collet (59), Sibbing (69), Giusti (70), Malek (72), Tiroch (73), Wallentin (63), Pare (65), Harmsze (74), Sawada (75), Bouman (76)	EC, SCA	51419	CYP2C19*2	MACE	OR 1.1 (0.89-1.39) p<0.36
						TS	OR 1.77 (1.31-2.40) p<0.001
Jang (77)	2012	Trenk (68), Simon (51), Collet (59), Sibbing (69), Giusti (70), Shuldner (43), Pare (65), Wallentin (63), Malek (72), Sawada (75), Tang (78), Oh (79)	EC SCA con ICP	20785	CYP2C19 (LOF)	MACE	OR 2.18 (1.37-3.47)
						SCA	OR 1.42 (1.12-1.81)
						TS	OR 2.41 (1.76-3.30)
Mega (80)	2010	Trenk (68), Simon (51), Collet (59), Sibbing (69), Giusti (70), Shuldner (43), Mega (54)	SCA	9685	CYP2C19 (LOF)	MACE	1LOF: HR 1.55, (1.11-2.27) p=0.01 2LOF: HR 1.76 (1.24-2.50) p=0.002
Holmes (81)	2011	Bouman (76), Campo (82), Collet (59), Giusti (70), Harmsze (74), Jeong (83), Komarov (84), Malek (72), Oh (79), Ono (85), Sawada (75), Shuldner (43), Sibbing (69), Simon (51), Tiroch (73), Trenk (68)	EC SCA	42016	CYP2C19 (LOF)	MACE	RR 1.18 (1.09-1.28)
Hulot (86)	2010	Trenk (68), Simon (51), Collet (59), Sibbing (69), Giusti (70), Shuldner (43), Mega (60)	SCA	11959	CYP2C19*2	MACE	OR 1.29 (1.12-1.49) P<0.001
						Mortalidad	OR 1.79 (1.10-2.91) p=0.019
						TS	OR 3.45 (2.14-5.57) p<0.001
Zabalza (87)	2012	Trenk (68), Simon (51), Collet (59), Sibbing (69), Giusti (70), Shuldner (43), Pare (65), Wallentin (63), Malek (72), Sawada (75), Tang (78), Oh (79), Tiroch (73), Harmsze (74)	SCA +/- ICP	16360	CYP2C19 (LOF)	MACE	≥500 indiv: HR 1.06 (0.89-1.26) <500 indiv: HR 3.55 (1.66-7.56)
						TS	HR 2.24 (1.52-3.30)
Su J (88)	2012	Simon (51), Wallentin (63), Mega (60), Spiewak M (89), Tiroch (73), Campo (82), Delaney JT (62), Jaitner J (90), Wang (91), Jeong YH (83)	SCA +/- ICP	19743	ABCB1	MACE	TT vs CC: OR 1.77 (1.19-2.63) p=0.005
Mao (92)	2013		SCA +/- ICP	23035	CYP2C19 (LOF)	MACE	OR 1.5 (1.21-1.87) p=0.0003
						SCA	OR 1.62 (1.35-1.95) p<0.00001
						TS	OR 2.08 (1.67-2.60) p<0.00001
						Revascularización repetida	OR 1.35 (1.1-1.66) p=0.004
						Mortalidad	p=0.5
						Hemorragia	p=0.93
Niu (93)	2015		SCA +/- ICP	44655	CYP2C19 (LOF)	MACE	OR 1.35 (1.14-1.60) p=0.001
						Ictus isquémico	OR 2.14 (1.36-3.38) p<0.001
Hou (94)	2014		SCA +/- ICP	2331	CYP2C19*2	MACE	OR 2.22 (1.85-2.65)

En un primer artículo publicado a principios de 2009, Collet et al. (59) evaluaron 259 pacientes menores de 45 años con un primer SCA tratados con clopidogrel durante al menos un mes, el 73% sometidos a ICP. Los portadores *CYP2C19*2* tenían un mayor riesgo de muerte, SCA y revascularización urgente ($p = 0,0005$, HR = 3,69) en comparación con aquellos que no.

Otros estudios posteriores también confirmaron la importancia de las variaciones en el gen *CYP2C19*, como el estudio de Mega (54). La función reducida del gen estaba presente en el 15% -30% de los pacientes con SCA, se asoció con concentraciones reducidas de fármaco activo, un 50% más de riesgo de muerte, infarto y ACV, así como 3 veces más riesgo de trombosis del stent.

Durante este período, se evaluaron los factores farmacogenéticos determinantes de la respuesta al clopidogrel entre 2208 pacientes inscritos en el French Registry of Acute ST-elevation and non-ST-elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) (51), el 68,7% sometidos a una ICP. Se evaluaron si diferentes genes previamente asociados con alteraciones farmacocinéticas o de actividad biológica del clopidogrel, también se asociaron con eventos cardiovasculares durante el primer año después del SCA. Los pacientes con algún alelo LOF en *CYP2C19* tenían 2 veces más eventos que los sujetos sin ninguno, y en los pacientes con ICP portadores de dos alelos, hasta 3,6 veces más. Los pacientes con dos variantes alélicas del *ABCB1* (TT) igualmente tenían un mayor riesgo de eventos cardiovasculares en el año, que los sin variación alélica (CC) (HR = 1,72; IC del 95%: 1,20-2,47). El resto de genes *CYP3A5*, *P2RY12*, or *ITGB3* no se asociaron con el pronóstico.

En el GWAS (Genome-wide association study) llevado a cabo en una población Amish con 429 personas sanas (43), el polimorfismo *CYP2C19*2* se asoció con una disminución de la respuesta al clopidogrel que estaba presente en el 33% de la población y representó el 12% de la variación de la respuesta a clopidogrel. Esta asociación se analizó en 277 pacientes con SCA e ICP, y el polimorfismo *CYP2C19*2* se asoció con una disminución de la respuesta plaquetaria al tratamiento con clopidogrel y con resultados cardiovasculares más pobres (HR = 2,42; IC 95%: 1,18-4,99; p = 0,02).

Sin embargo, en pacientes de más bajo riesgo el beneficio es menos evidente. Así Pare et al (65) genotiparon los alelos LOF *CYP2C19* en 5059 pacientes de dos ensayos aleatorios (CURE (21) y ACTIVE (95)), sólo el 14,5% de los pacientes sometidos a ICP con stent. Ellos mostraron que el efecto de clopidogrel en comparación con el placebo en el evento primario fue independiente del estado de portador del *CYP2C19*2*. Resultados similares fueron informados del subestudio genético realizado en pacientes de bajo riesgo y sin stent en el estudio CHARISMA (64). Más recientemente en un subestudio genético del TRILOGY (66), pacientes con SCA con manejo inicial no invasivo tratados con clopidogrel o Prasugrel, el genotipo *CYP2C19* no se asoció con el combinado de muerte cardiovascular, infarto de miocardio o ACV.

Por esta diversidad de resultados en los estudios observacionales, se han realizado diversos meta-análisis evaluando el efecto en resultados cardiovasculares de los polimorfismos en *CYP2C19* y *ABCB1* (tabla 2).

En resumen, la mayoría de estos meta-análisis mostraban una asociación

significativa de los alelos LOF en *CYP2C19* con eventos cardiovasculares adversos en pacientes tratados con clopidogrel. No obstante, existían diferencias en el grado o magnitud de la asociación, con tres escenarios fundamentalmente:

- Un escenario de “baja discriminación de eventos”, como el metaanálisis de Holmes et al (81) que demostró un mayor riesgo de eventos cardiovasculares pero con un riesgo relativo (RR) bajo de 1,18 (IC 95%: 1,09-1,28), o el de Bauer's et al (71) que encontró asociación con la trombosis del stent (RR 1,77; $p < 0,001$) pero no con el combinado de eventos cardiovasculares adversos.

- Un escenario de “alta discriminación de eventos”, como el de Sofi et al (67) con un aumento marcado del riesgo de eventos cardiovasculares adversos (RR 1,96; IC del 95%: 1,14-3,37; $p = 0,02$) y un alto riesgo de trombosis del stent (RR = 3,82; 95% IC: 2,23-6,54, $p = 0,0001$). Riesgos similares se encontraron en los metaanálisis de Mega et al (80), Mao et al (92), Jan et al (77) y Hulot et al (86).

- Un escenario “intermedio” donde el grado de asociación dependía de alguna característica: En Niu et al (93) los portadores asiáticos mostraron un mayor riesgo de eventos (RR: 1,96 $p < 0,001$) que los portadores occidentales (RR: 1,16 $p = 0,041$). En Zabalza et al (87) el riesgo fue mayor en los estudios con un tamaño de muestra < 500 pacientes (HR = 3,55; IC del 95%: 1,66-7,56) y menor entre los estudios con una muestra ≥ 500 (HR = 1,06; IC del 95%: 0.89-1.26)

Estas diferencias en el grado de asociación se explicarían en primer lugar por el riesgo de la población de tratamiento, ya que la asociación fue menor en los pacientes con enfermedad estable sin ICP y mayor en los pacientes con SCA, sobre todo si recibieron ICP con stent. Del mismo modo, se aplicaron diferentes

definiciones del objetivo principal, siendo mayor la asociación con la trombosis de stent. Y por último, hubo una gran heterogeneidad de los estudios incluidos en los meta-análisis, determinado en parte por el diferente tamaño de población de los estudios incluidos, siendo mayor la asociación cuando se consideraban los estudios con población más homogénea.

Los polimorfismos del gen *ABCB1* han sido evaluados en un solo meta-análisis, el de Su et al (88). La variante *ABCB1*-TT se asoció con el riesgo de eventos cardiovasculares adversos tempranos (TT vs CC: O 1,77; IC del 95%: 1.19-2.63; p = 0,005).

Sobre la base de esta evaluación, la relevancia clínica de aplicar la farmacogenética de los polimorfismos *CYP2C19* y *ABCB1* en el uso clínico de clopidogrel, debería tener una indicación específica para conseguir demostrar beneficio. Es decir, el mayor valor clínico de estas pruebas genéticas sería utilizándolo en la población de pacientes de más riesgo, como aquellos con SCA y que han sido sometidos a ICP (96).

En octubre de 2010, la FDA y posteriormente la EMA incorporaron en la ficha técnica del medicamento una advertencia sobre clopidogrel, para alertar a los médicos de la disminución de la eficacia en los pacientes que eran pobres metabolizadores del *CYP2C19*, lo que conlleva a un aumento de las tasas de eventos cardiovasculares tras un infarto. Informaba sobre el papel de las pruebas genéticas para los pacientes que toman clopidogrel y la consideración de buscar tratamientos alternativos, "otros medicamentos antiagregantes o estrategias alternativas de dosificación" para los metabolizadores pobres (97).

1.3.3 Nuevos antiagregantes: Prasugrel y Ticagrelor

Prasugrel

Prasugrel, como clopidogrel, es una tienopiridina pero con 10 veces mayor actividad inhibitoria del receptor P2Y₁₂ (98, 99). Prasugrel tiene un inicio de acción más rápido, se une al receptor P2Y₁₂ de forma irreversible e inhibe la actividad de las plaquetas de forma más consistente y extensa que las dosis estándar o altas de clopidogrel (100-105). Prasugrel es un profármaco, se metaboliza en un solo paso a través del sistema CYP450, y no es susceptible de polimorfismos genéticos conocidos hasta ahora ni de interacciones fármaco-fármaco que se asocian con peores resultados cardiovasculares (103). Tabla 3.

En el estudio TRITON-TIMI 38 (Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel-Thrombolysis in Myocardial Infarction), pacientes con SCA sometidos a ICP fueron tratados con clopidogrel (dosis de 300 mg de carga, luego 75 mg al día) o prasugrel (dosis de carga de 60 mg, y luego 10 mg diarios) con seguimiento a lo largo de los siguientes 6-15 meses (20). Los pacientes tratados con prasugrel, tuvieron una reducción del riesgo relativo del 19% en la variable principal de eficacia (muerte por causas cardiovasculares, IAM y ACV no fatal) en comparación con clopidogrel. Además, la frecuencia de trombosis temprana y tardía de stent se redujo en un 52%. Este beneficio se magnifica en grupos de alto riesgo, como los pacientes con diabetes mellitus o IAMCEST, y era evidente ya en el día 3 (20, 106). El beneficio de prasugrel frente a clopidogrel fue consistente en los subgrupos de pacientes con diabetes (insulina y no insulino-dependiente).

Tabla 3. Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los inhibidores P2Y12 (104, 105)

	Ticlopidina	Clopidogrel	Prasugrel	Ticagrelor
Estructura química	Tienopiridina	Tienopiridina	Tienopiridina	Cp-triazopirimidina
Unión Receptor	Irreversible	Irreversible	Irreversible	Reversible
Pro-fármaco	Si	Si	Si	No
Metabolismo CYP P450	CYP 3A4	CYP 1A2, 2B6, 2C19, 2C9, 3A4, 3A5	CYP 3A4, 2B6, 2C9 2C19	CYP 3A4 o CYP 3A5
Aclaramiento	Renal 60% Fecal 23%	Renal 50% Fecal 46%	Renal 68% Fecal 27%	Renal <1% Fecal 99%
Metabolito activo		15%	85%	95-100%
Concentración plasmática pico	1-3 horas	1 hora	30-60 mins	1.5-3 horas
Pico inhibición Plaquetaria	2-5 días	300 mg: 6 hrs 600 mg: 2 hrs	1-2 hrs	2 hrs
Vida media plasma	12 horas	8 horas	7 horas	6-12 horas
Tiempo "steady state"	2-5 días	3-7 días	2-4 días	2-3 días
Inhibición plaquetaria		≈ 50%	≈ 70%	≈ 95 %
Duración efecto	7-10 días	7-10 días	7-10 días	3-5 días
Interacción / polimorfismos	Si	Si	No	No

Sin embargo, prasugrel se asoció con un aumento estadísticamente significativo de hemorragia mayor TIMI no relacionada con cirugía de revascularización coronaria (CABG), sangrado mayor y menor TIMI, y hemorragia

mortal. Algunos grupos eran particularmente susceptibles a las hemorragias: ancianos (edad ≥ 75 años), bajo peso (<60 kg), y evento cerebrovascular previo. En el pequeño número de pacientes con un accidente cerebrovascular o ataque isquémico transitorio, prasugrel aumentó significativamente la tasa de hemorragia intracraneal.

Las complicaciones hemorrágicas relacionadas con el tratamiento han sido ligadas a mortalidad posterior en pacientes con enfermedad cardiovascular (107). El aumento de la hemorragia relacionada con prasugrel anuló parcialmente los beneficios de la prevención del IAM y trombosis del stent. Como resultado, no hubo diferencias estadísticas entre prasugrel y clopidogrel en todas las causas de mortalidad (3,0% frente a 3,2%) a los 15 meses. El tratamiento con prasugrel demostró un beneficio clínico neto (la combinación de eventos isquémicos y sangrados) frente a clopidogrel en pacientes con diabetes, pacientes con STEMI y más jóvenes. Sin embargo, no hubo ningún beneficio clínico neto en los pacientes de edad ≥ 75 años y con peso menor de 60 kg, y prasugrel se asoció con daño clínico neto en los pacientes con ictus previo o ataque isquémico transitorio.

Prasugrel fue aprobado en 2009 en Europa y Estados Unidos para el tratamiento del SCA en pacientes que vayan a someterse a ICP con indicación clase I nivel de evidencia B en las guías de práctica clínica (12, 13, 108, 109). La FDA no recomienda su uso en ≥ 75 años o bajo peso, mientras que la EMA aconseja en estos casos emplear dosis de 5 mg (110). Está contraindicado en caso de ictus previo.

En los pacientes con angina inestable o IAMSEST que “no se someten a revascularización”, prasugrel no redujo la frecuencia de eventos cardiovasculares

en comparación con clopidogrel, aunque se observaron los mismos riesgos de hemorragia tras incluir los ajustes de dosis recomendados (111). La administración de prasugrel en el momento del diagnóstico del SCA en comparación con la administración después de conocer la angiografía coronaria e indicar la ICP no redujo la tasa de eventos isquémicos y por el contrario aumentó la tasa de complicaciones hemorrágicas graves (112).

Ticagrelor

Ticagrelor, a diferencia de clopidogrel y prasugrel, tiene una acción antagonista del receptor P2Y12 directa y reversible. Es una nueva clase de agentes, las ciclopentilo triazolo-pirimidinas. Ticagrelor proporciona una mayor inhibición, más rápida y consistente que clopidogrel. Tabla 3.

El ticagrelor es metabolizado por el sistema CYP450 a un metabolito activo equipotente, (113, 114). Los polimorfismos genéticos que afectan a la absorción y metabolismo del clopidogrel no afectan al ticagrelor (63). Casi todos los pacientes que no responden a clopidogrel, cuando se cambian a ticagrelor tuvieron una reducción en el nivel de actividad de las plaquetas (115).

En el estudio PLATO (Study of Platelet Inhibition and Patient Outcomes), los pacientes con SCA fueron tratados con clopidogrel (dosis de carga de 300 mg con 300 mg adicionales en los pacientes sometidos a ICP, luego 75 mg al día) o ticagrelor (180 mg de dosis de carga con un 90 mg adicionales para los pacientes sometidos a ICP, luego 90 mg dos veces al día) y seguidos durante los siguientes 12

meses (6). En los pacientes tratados con ticagrelor, hubo una reducción del riesgo relativo del 16% en la variable principal de eficacia (muerte por causas cardiovasculares, infarto de miocardio y ACV). Hubo una reducción del riesgo relativo del 22% en la mortalidad por todas las causas, y el riesgo de trombosis de stent se redujo en un 33%.

No hubo, globalmente, diferencias significativas en la variable principal de seguridad, la hemorragia grave o la combinación de hemorragia mayor y menor entre los grupos de ticagrelor y clopidogrel. Sin embargo, se incluyeron las hemorragias relacionadas con CABG (el 70% de las hemorragias mayores del estudio). Cuando los criterios de sangrado utilizados en el estudio TRITON-TIMI 38 se aplicaron a PLATO (excluyendo hemorragia relacionada con CABG), hubo igualmente un aumento estadísticamente significativo en el sangrado y en hemorragias intracraneales fatales con Ticagrelor (116). Las hemorragias mayores conllevaron un aumento en el riesgo de mortalidad posterior (117)

Ticagrelor fue aprobado en 2011 en Europa y Estados Unidos para el tratamiento del SCA manejados tanto de forma invasiva como conservadora, con indicación clase I nivel de evidencia B en las guías de práctica clínica (12, 13, 108, 109)

1.4 Estrategias de elección del tratamiento antiagregante.

Dado que tanto prasugrel como ticagrelor han mostrado resultados superiores a clopidogrel en los ensayos pivotaes, estos nuevos agentes son ahora preferidos a clopidogrel como terapia de primera línea en combinación con el AAS, para la mayoría de los pacientes con SCA, según las recomendaciones de las guías tanto europeas y americanas (12, 13, 108, 109).

Sin embargo, a pesar de este beneficio de los nuevos bloqueadores P2Y12 en la prevención de nuevos eventos trombóticos en el SCA, existen importantes limitaciones, principalmente relacionadas con la seguridad debido al riesgo de hemorragias que conllevan, sin olvidar que actualmente sus costes son sustancialmente más altos que los de clopidogrel y que con ellos se han realizado un menor número de estudios tras su autorización.

Hemorragias:

El sangrado ha surgido como un resultado adverso importante en los pacientes con SCA. Actualmente se estima que una hemorragia grave tiene lugar en un 3-5% de los SCA, siendo las hemorragias leves más frecuentes entorno a un 5-10% (118). En cuanto a la localización, el sangrado más frecuente es el gastrointestinal (31,5%), seguido del sangrado en la zona de acceso vascular en los pacientes sometidos a revascularización percutánea (23,8%), sangrado retroperitoneal (6%) y genitourinario (4,8%). Pero, lo que es más importante, los pacientes que sufren hemorragias graves durante el ingreso por un SCA tienen 5 veces más riesgo de muerte, IAM e ictus en los primeros 30 días, y este riesgo es

independiente de si se practica o no revascularización percutánea. La influencia de la hemorragia mayor en la mortalidad parece equivalente al efecto de un infarto y además, persiste durante el seguimiento a largo plazo en contraste con la influencia del infarto en la mortalidad que es principalmente a corto plazo (107, 119, 120). Diferentes mecanismos han sido implicados en el efecto adverso de las hemorragias (121, 122).

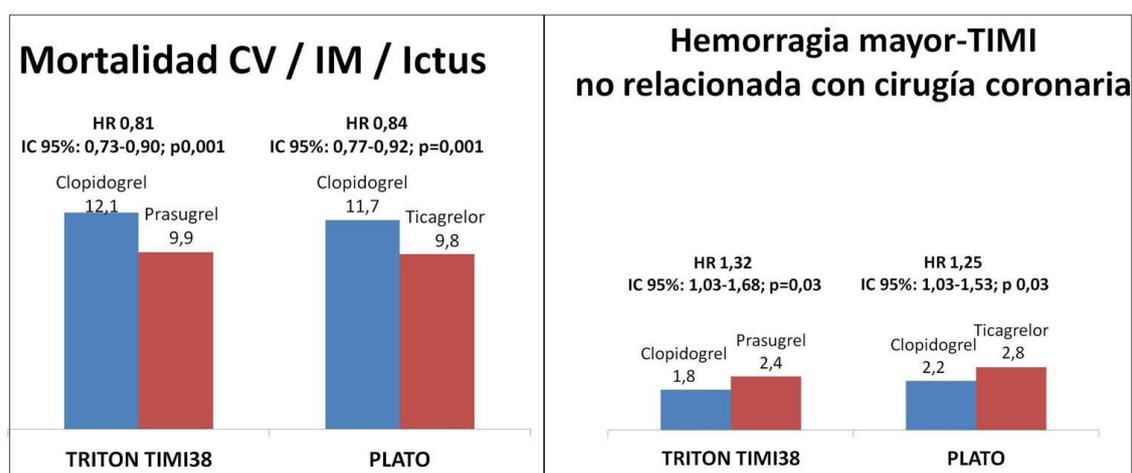


Figura 6. Tasas de eventos y hemorragias con clopidogrel y los nuevos antiagregantes

Las diferentes guías sobre el tratamiento de los pacientes con SCA establecen que la preferencia para una estrategia particular debe tener en cuenta el riesgo de isquemia, así como el riesgo de hemorragia (1, 22) . Figura 6.

Los nuevos antiagregantes comparados con prasugrel reducen la muerte cardiovascular, IAM e ictus tanto Prasugrel (9,9% vs 12,1%; HR 0,81; IC 95%: 0,73-0,90; p0,001) como Ticagrelor (9,8% vs 11,7%; HR 0,84; IC 95%: 0,77-0,92; p=0,001). Sin embargo, la hemorragia TIMI mayor no relacionado con CABG se

incrementó frente a clopidogrel tanto con Prasugrel (2,4% versus 1,8%; HR 1,32; IC 95%: 1,03-1,68; p=0,03) como con Ticagrelor (2,8% versus 2,2%; HR 1,25; IC 95%: 1,03-1,53; p 0,03). Prasugrel mostró un aumento del riesgo estadísticamente significativo de hemorragia potencialmente mortal tanto por eventos fatales y no fatales espontáneos, y Ticagrelor incremento significativamente las hemorragias intracraneales fatales.

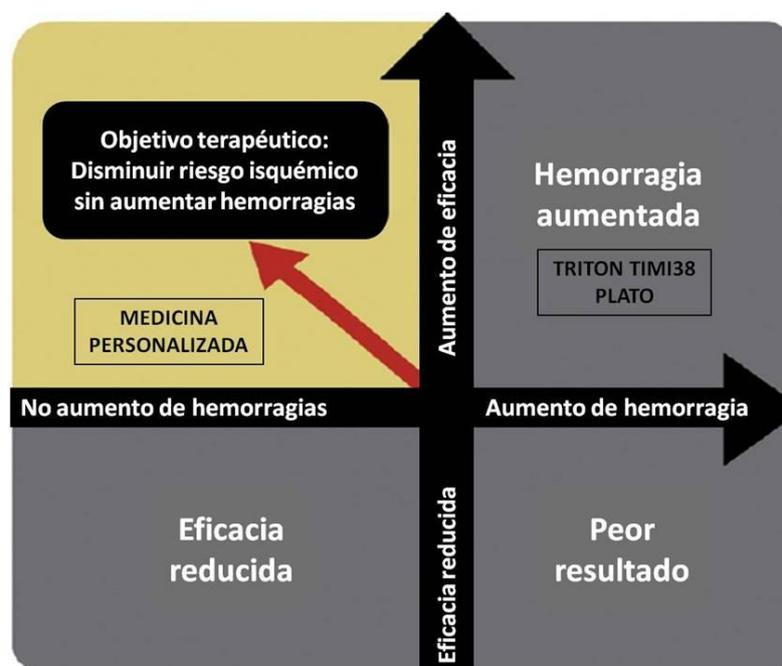


Figura 7. Regimen antiagregante óptimo: balance entre seguridad y eficacia

El régimen antiplaquetario óptimo en cuanto a eficacia y seguridad debería lograr la mayor reducción de los eventos trombóticos con el riesgo de sangrado más bajo. Figura 7.

Costes:

La disponibilidad de clopidogrel como un medicamento genérico hace que el coste anual del tratamiento con Ticagrelor y Prasugrel sea muy superior, lo que supone un impacto económico potencial alto dado la elevada incidencia del SCA en la población.

En el informe CADIME (123) se calculó en Andalucía el coste incremental respecto clopidogrel por año de tratamiento y en euros de 556-550 para prasugrel y 888- 881 para Ticagrelor. Considerando una estimación de 18.524 pacientes con SCA en Andalucía en el año 2013, en el supuesto de que el 100% de los pacientes en tratamiento con clopidogrel se pasaran a ser tratados con ticagrelor, se ha estimado un impacto económico de aproximadamente 16 millones de €. Teniendo en cuenta que el 52% de los pacientes son menores de 65 años, la aportación por estos sería de hasta 5 millones de euros. El coste de los medicamentos se ha alegado como un factor de falta de persistencia del tratamiento antiplaquetario contemporáneo en los pacientes con SCA sometidos a ICP (124).

La factura farmacéutica supone entre el 25 y el 30% del gasto sanitario público total en España. Gastamos un 1,27% del PIB en medicamentos (125). En esta época de amenazas para el sistema público de salud, hay que buscar estrategias que permitan el uso más eficiente de los medicamentos.

Estrategias:

En busca de la estrategia de elección del tratamiento antiagregante con balance óptimo entre seguridad y eficacia, de la forma más eficiente, se trataría de

evitar la pérdida de eficacia por la resistencia a clopidogrel, pero evitando el exceso de hemorragias graves con el uso de los nuevos antiagregantes.

Para ello se han planteado alternativas como el uso de dosis altas tanto de AAS como de clopidogrel, o una estrategia antiagregante “personalizada”. Esta consistiría en identificar a los pacientes con una respuesta pobre a clopidogrel, bien basado en pruebas de función plaquetaria o en el genotipado, y dar a ellos de forma “selectiva” un tratamiento alternativo (dosis altas de clopidogrel o los nuevos antiagregantes), utilizando la dosis estándar de clopidogrel para los buenos respondedores.

Existen algunas evidencias que han evaluado estas diferentes estrategias y que exponemos a continuación.

1.4.1 Uso de dosis altas de AAS o clopidogrel

Incrementar AAS.

En general, el AAS a dosis altas (>100 mg) no mejora la eficacia clínica, pero puede exponer a los pacientes a un mayor riesgo de sangrado gastrointestinal, por lo que se recomienda una dosis de mantenimiento de AAS baja (≤ 100 mg) con inhibidores de P2Y₁₂. Sólo un gran ensayo, CURRENT OASIS-7 (Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes: a randomised factorial trial”) (126), comparó AAS a dosis baja (75-100 mg) y dosis alta (300-325 mg) en pacientes con SCA y no encontró diferencias en el

riesgo de muerte cardiovascular, IAM o ACV a 30 días en la población total ni en el subgrupo de pacientes que se sometieron a ICP. Sin embargo, hubo una mayor tasa de hemorragia gastrointestinal en el grupo de AAS en dosis altas (0,24% frente a 0,38%, $p = 0,051$). De manera similar, se observó un mayor riesgo de sangrado con dosis altas de AAS en el análisis post hoc del ensayo HORIZONS-AMI (“Bivalirudin during primary PCI in acute myocardial infarction”) (127).

Dosis altas de clopidogrel.

Igualmente, el ensayo CURRENT-OASIS-7 (126) evaluó la eficacia y seguridad de clopidogrel a dosis alta (600 mg de dosis de carga, seguido de 150 mg/día durante 7 días y seguido por 75 mg/día) frente a clopidogrel en dosis estándar (300 mg de carga seguido de 75 mg/día) en pacientes con SCA (STEMI o SCASEST) en los que se planeó ICP.

Globalmente no hubo diferencias significativas en la prevención de eventos isquémicos (4,2% frente a 4,4%), sólo una discreta reducción en el subgrupo sometido a ICP con la dosis mayor de clopidogrel (3,9% frente a 4,5%; $p=0.035$). Sin embargo, el tratamiento a dosis altas aumentó el sangrado mayor en todo el grupo (2,5% frente a 2,0%; $p=0.012$) y en el subgrupo con ICP (1,1% versus 0,7%; $p=0.008$), con lo que el beneficio de dar una mayor dosis de clopidogrel fue anulado por el aumento de la hemorragia mayor.

1.4.2 Estrategia “personalizada” guiada por test de agregación

Numerosos estudios observacionales prospectivos, incluyendo grandes poblaciones de pacientes, han demostrado que la reactividad plaquetaria elevada (HPR) es un predictor independiente y fuerte de eventos isquémicos posterior a una ICP. Una alta reactividad plaquetaria durante el tratamiento se ha asociado con un aumento significativo en el IAM no fatal, trombosis del stent o mortalidad cardiovascular en varios meta-análisis independientes (128, 129).

En teoría, hay dos opciones para intensificar la inhibición plaquetaria en pacientes con HPR: ajuste de dosis de clopidogrel o cambiar a inhibidor P2Y12 más potente en pacientes con reactividad plaquetaria alta.

1.4.2.1 Ajuste de dosis de Clopidogrel

Muchos estudios farmacodinámicos han demostrado que el aumento de la dosis de carga o de mantenimiento de clopidogrel mejora significativamente la inhibición plaquetaria (130), sin embargo su impacto clínico ha sido nulo.

En un primer gran ensayo que comparó dosis altas de clopidogrel (600 mg adicionales en dosis de carga y 150 mg de dosis de mantenimiento) frente a dosis estándar para los pacientes con HPR fue el estudio “Gauging Responsiveness with AVerifyNow assay—Impact on Thrombosis And Safety” (GRAVITAS) (38). En este estudio, se encontró que el 41% de pacientes tenían HPR 12-24 h después de la ICP por angina estable o debido a SCASEST. El criterio de valoración principal de muerte cardiovascular, IAM o trombosis del stent a los 6 meses fue idéntico entre

los grupos de dosis altas y dosis estándar. Los eventos hemorrágicos moderados / severos tampoco fueron significativamente diferentes.

El estudio “Responsiveness to Clopidogrel and Stent Thrombosis 2-ACS” (RE-CLOSE-2 ACS) (131) un registro observacional de un solo centro evaluó el aumento de la dosis de clopidogrel en pacientes con SCA con HPR después de la ICP. Los pacientes con HPR persistieron significativamente con mayor riesgo de eventos isquémicos adversos a pesar del ajuste de dosis de clopidogrel, en comparación con los pacientes sin HPR, incluyendo un mayor riesgo de mortalidad.

Más recientemente, el estudio multicéntrico y randomizado “Assessment by a Double Randomization of a Conventional Antiplatelet Strategy vs. a Monitoring-guided Strategy for Drug-Eluting Stent Implantation and of Treatment Interruption vs. Continuation One Year after Stenting” (ARCTIC) (132), usó el test VerifyNow en pacientes con angina estable o SCASEST sometidos a ICP. En el grupo guiado, se realizaron ajustes del tratamiento según la reactividad plaquetaria antes de la implantación del stent y durante la fase de seguimiento (incluyendo clopidogrel a dosis altas, AAS a dosis altas e inhibidores del receptor IIb/IIIa). El objetivo combinado de eventos cardiovasculares mayores (MACE) fue similar después de 1 año entre los grupos de tratamiento.

Un meta-análisis posterior sugirió que el riesgo clínico basal y la realización de ICP debería tenerse en cuenta cuando se selecciona la estrategia antiplaquetaria óptima junto a la reactividad plaquetaria (133).

1.4.2.2 Cambiar a un inhibidor P2Y12 más potente

El único ensayo aleatorizado, el “Testing platelet Reactivity In patients underGoing elective stent placement on clopidogrel to Guide alternative thErapy with pRasugrel” (TRIGGER-PCI), en pacientes con angina estable sometidos a ICP y con HPR por el test VerifyNow, aleatorizados para recibir clopidogrel o prasugrel, se terminó prematuramente debido a falta de beneficio (134).

Posteriormente el registro prospectivo de un solo centro, en el SCA sometido a ICP (135), usando el test Multiplate después de una dosis de carga de 600 mg de clopidogrel, demostró que Prasugrel fue significativamente más eficaz que clopidogrel en dosis altas en la reducción de eventos trombóticos en pacientes con HPR, mientras que los buenos respondedores a clopidogrel tenían similar riesgo de eventos que los tratados con Prasugrel (135)

Las principales desventajas que supone guiar el tratamiento antiagregante por los test de agregación serían:

- > Diferencias metodológicas sustanciales entre los distintos test de agregabilidad dando lugar a heterogeneidad en la identificación de los sujetos en riesgo de eventos trombóticos.

- > Igualmente hay gran heterogeneidad de los resultados en función del tipo de patología, SCA o cardiopatía estable, y el momento temporal en que se realiza con respecto a la presentación clínica.

- > Aunque hay actualmente cuatro métodos recomendados (VerifyNow,

Multiplate, VASP, LTA), miden diferentes aspectos de la fisiología de las plaquetas y algunos se ven obstaculizados por la falta de estandarización y técnica engorrosa, con puntos de corte no bien definidos para identificar a los pacientes de alto riesgo.

> Por último, si bien se han demostrado útiles como marcador pronóstico de eventos, no ha habido estudios randomizados que demuestren una mejora en los resultados clínicos mediante el uso de estos test, por lo que en la actualidad no se aconseja su uso en la práctica clínica.

1.4.3 Estrategia personalizada por genotipado *CYP2C19* y *ABCB1*

Ya analizamos en la sección 1.3.2.2 los numerosos estudios que han analizado la asociación entre las variantes genéticas *CYP2C19* y *ABCB1* con los eventos clínicos, en pacientes con enfermedad coronaria tratados con clopidogrel, sobre todo aquellos de alto riesgo como tras un infarto o tras una ICP con stent. El objetivo mediante la farmacogenética se centraría en conseguir prescribir al paciente el medicamento más adecuado según su perfil genético, para conseguir el mejor efecto terapéutico con el menor efecto tóxico posible. Es decir, en aquellos portadores de genotipo con pobre respuesta a clopidogrel, la mejor estrategia sería el uso de los inhibidores P2Y₁₂ más potentes, prasugrel o ticagrelor, y utilizar la dosis estándar de clopidogrel en los portadores de genotipo de buena respuesta.

Frente a los test de agregación plaquetaria las ventajas del uso del genotipado para guiar el tratamiento antiagregante, serían que los genes son constantes e invariables, independientes del momento temporal y el tratamiento

que haya recibido el paciente; existen unos polimorfismos concretos definidos que han demostrado su implicación; la disponibilidad hoy en día de una técnica diagnóstica estandarizada, relativamente accesible y contrastada (tecnología Tagman®, ver anexo I); por último, se ha demostrado como un marcador pronóstico de eventos cardiovasculares. Sin embargo, las guías no aconsejan todavía su uso para guiar el tratamiento, por la ausencia de estudios que hayan analizado su beneficio en eventos clínicos.

Las evidencias iniciales de esta estrategia proceden de: a) sub-estudios genéticos de los ensayos pivotaes de Prasugrel (estudio TRITON-TIMI 38) (20) y Ticagrelor (estudio PLATO) (6) comparados ambos con clopidogrel, en los que se analizaron post-hoc los resultados según el genotipo de los pacientes; b) de estudios que han utilizado la estrategia guiada por genotipado, aunque con un objetivo principal no clínico; y c) de estudios de coste-eficacia.

1.4.3.1 Subestudio genético del ensayo TRITON-TIMI 38

Dos estudios genéticos post-hoc del TRITON-TIMI 38 han sido publicados por Mega et al. (54, 60): 2932 pacientes con SCA sometidos a ICP tratados con clopidogrel (n = 1471) o prasugrel (n = 1461).

En una primera aproximación (54), examinaron las variantes genéticas del *CYP2C19* y los eventos cardiovasculares en el subgrupo de clopidogrel. Los pacientes portadores de alelos con LOF tenían un mayor riesgo de muerte cardiovascular, accidente cerebrovascular o SCA en comparación con los no

portadores (HR 1,53; IC del 95%: 1,7-2,19, $p = 0,01$) y un aumento del riesgo de trombosis del stent (RR de 3,09; 95%: 1,19-8,00, $p = 0,02$).

Meses después, en un segundo artículo (60) se evaluó el efecto de los polimorfismos en *ABCB1* de forma individual o en combinación con las variantes en *CYP2C19*, y la aparición de eventos cardiovasculares bajo tratamiento con clopidogrel y prasugrel. Los pacientes tratados con Prasugrel, divididos en base a los genotipos *ABCB1* 3435C → T y al estado *CYP2C19*, no se asociaron significativamente con los resultados clínicos. Por el contrario, los participantes tratados con clopidogrel con los genotipos de riesgo (*CYP2C19**2 y/o *ABCB1* 3435 TT) fueron predictores independientes de muerte cardiovascular, ACV o IAM: *ABCB1* 3435 TT vs CT / CC, HR 2,01; IC del 95%: 1,30-3,11, $p = 0,0017$; y, portadores LOF en *CYP2C19* frente a no portadores, HR 1,77; IC del 95%: 1,11-2,80; $p = 0,0155$). Cuando se dividieron en cuatro grupos en función del genotipo *ABCB1* 3435 C> T y del genotipo *CYP2C19*, los que no llevaban ninguno de estos genotipos de riesgo tenían una tasa significativamente más baja de muerte cardiovascular, IAM o ACV a los 15 meses, que aquellos que eran portadores de alguno o ambos alelos de riesgo. Y además, estos pacientes que no llevaban genotipos de riesgo en ninguno de los dos genes mostraron una tasa de eventos cardiovasculares similar a los pacientes tratados con Prasugrel.

Durante este período, otro estudio post-hoc publicado por Sorich et al (61) concluyó que la integración de los datos de TRITON-TIMI 38, centrado en el genotipo *CYP2C19*, podía discriminar entre individuos que reciben un gran beneficio de usar prasugrel en lugar de clopidogrel, e individuos con resultados

clínicos comparables con prasugrel y clopidogrel.

Por lo tanto, el genotipado tenía el potencial de guiar la elección de la terapia antiplaquetaria, y sugería que más investigaciones estarían justificadas para validar esta hipótesis.

1.4.3.2 Subestudio genético del ensayo PLATO

En el estudio PLATO (6), ticagrelor y clopidogrel se compararon en pacientes con SCA, más del 80% con IAM, aunque sólo el 64% recibió ICP. En el subestudio genético (63), los resultados de Ticagrelor no se afectaban por las variantes genéticas del *CYP2C19* y *ABCB1*.

El evento primario se produjo con menos frecuencia con Ticagrelor que con clopidogrel, independientemente del genotipo *CYP2C19*: 8,6% frente a 11,2% (HR 0,77; IC 95%: 0,60-0,99; p = 0,0380) en pacientes con cualquier alelo de pérdida de función; y 8,8% frente a 10,0% (HR 0,86; IC 95%: 0,74-1,01; p = 0,0608) en aquellos sin alelo de pérdida de función. Para el genotipo *ABCB1*, las tasas de eventos para el resultado primario también fueron consistentemente más bajas con ticagrelor que en el grupo clopidogrel para todos los grupos de genotipo (8,8% vs 11,9%; HR 0,71; IC 95%: 0,55-0,92 para el genotipo de alta expresión).

Sin embargo, cuando ambos genotipos eran tomados de forma conjunta, en ausencia de alelos en el *CYP2C19* ni en *ABCB1* de alto riesgo de fallo a clopidogrel, Ticagrelor y clopidogrel obtuvieron resultados cardiovasculares similares. (8,9% versus 9,5%, HR 0,92; IC 95% 0,77-1,11, p=0,39). Estos datos, también apoyarían

el uso del genotipado para guiar la elección de la terapia antiplaquetaria, pendiente de más investigaciones.

1.4.3.3 Evidencias previas de tratamientos guiados por farmacogenética:

En 2012, Roberts et al. (136) publicaron los resultados del estudio RAPID GENE, un ensayo clínico que se centra en hacer un estudio genético del *CYP2C19* en pacientes con SCA o enfermedad coronaria estable que van a ser sometidos a ICP. Randomizaron a 200 pacientes entre recibir tratamiento convencional (clopidogrel) o hacer un test genético para identificar a los portadores *CYP2C19*2*. Los que eran portadores del alelo *CYP2C19*2* se les prescribió prasugrel y los que no llevaban este alelo se les administró clopidogrel. El objetivo era evaluar la reactividad plaquetaria (>234 unidades PRU) medida al día 7. Al final 187 pacientes terminaron el estudio, 91 en el grupo de estudio genético y 96 que recibieron tratamiento estándar. Al analizar los resultados de actividad plaquetaria, en el grupo de los pacientes con test genético, ninguno de los 23 pacientes que portaban el alelo *CYP2C19*2* presentó actividad plaquetaria elevada (>234) en el día 7, comparado con 7 pacientes (30%) que recibieron tratamiento convencional sin test genético ($p=0.0092$).

Más recientemente el mismo grupo confirmó que la identificación de estas variantes genéticas en pacientes con IAMCEST sometidos a ICP era factible realizar a la cabecera del enfermo y demostró que el tratamiento de los portadores *CYP2C19*2* and *ABCB1* TT con Prasugrel resultó en una reducción significativa en

la reactividad plaquetaria después de un mes comparado con el aumento de la dosis de clopidogrel (137).

1.4.3.4 Estudio de coste-eficacia con farmacogenética.

Diferentes estudios de coste-efectividad apoyan que el genotipado previo a la elección del fármaco antiagregantes es coste-efectiva, aunque todos los estudios publicados hasta el momento se han centrado en el genotipo *CYP2C19*.

Un primer estudio, con el modelo de decisión basado en la ocurrencia de eventos en el ensayo TRITON-TIMI 38, la rentabilidad de la selección guiada por genotipo de terapia antiplaquetaria en comparación con la selección de clopidogrel o prasugrel independientemente del genotipo, puede ser más rentable y puede proporcionar más valor clínico debido a menos resultados adversos (138).

En un segundo estudio, se examinaron cinco estrategias: clopidogrel genérico, prasugrel, ticagrelor y genotipado para polimorfismos *CYP2C19* con los portadores de alelos de pérdida de función que recibieron Ticagrelor (genotipado Ticagrelor) o Prasugrel (genotipado Prasugrel) y los no portadores que recibieron clopidogrel. La estrategia guiada por genotipo mejoraba la rentabilidad de prasugrel y ticagrelor después de la intervención coronaria percutánea en el SCA, aunque ticagrelor para todos los pacientes puede ser una alternativa económicamente razonable en algún contexto: asumiendo el modelo con más bajo valor predictivo del genotipo de eventos isquémicos, en poblaciones o regiones con una alta prevalencia de alelos de pérdida de función superior al 52,7% (sólo

descrita en Oceanía) y en los mercados de atención médica donde el costo mensual del ticagrelor frente a clopidogrel genérico sea menor de 215 dólares (139)

Por último, un estudio más reciente con un modelo analítico de decisión que incluyó cuatro estrategias antiplaquetarias: clopidogrel, inhibidor P2Y₁₂ (prasugrel o ticagrelor), terapia guiada por farmacogenética y terapia guiada por pruebas de reactividad de plaquetas. La terapia guiada por genotipado fue la opción preferida con el menor costo y más años de vida ajustados por calidad de vida en pacientes con SCA con ICP (140).

Por tanto, parece justificado económicamente el llevar a cabo una estrategia de genotipado en la elección del tratamiento antiagregante doble en pacientes con SCA con ICP, aunque no se ha analizado aún el impacto de usar de forma combinada los polimorfismos *CYP2C19* y *ABCB1*.

1.5 Justificación del estudio

De la evidencia comentada anteriormente, tanto prasugrel como ticagrelor frente a clopidogrel reducen el riesgo de muerte CV, infarto e ictus entre un 19% y 16%, pero incrementan el riesgo de hemorragias entre un 32% y 25% respectivamente. El genotipo parece discriminar entre individuos que reciben el mayor beneficio de usar los nuevos antiagregantes en lugar de clopidogrel, e individuos con resultados clínicos comparables entre ambos.

Por tanto, buscando el balance óptimo entre seguridad y eficacia, disminuyendo el riesgo isquémico sin incrementar las hemorragias, y

probablemente siendo más costo-eficaz, existe un gran interés en investigar los beneficios potenciales de las “estrategias personalizadas” que enfocan el uso de los nuevos inhibidores de P2Y12 a los pacientes en alto riesgo de pobre respuesta al clopidogrel, usando como guía la farmacogenética.

Las últimas revisiones publicadas con respecto a la aplicación de la farmacogenética en distintas patologías incluyendo las enfermedades cardiovasculares destacan la importancia de los estudios genéticos en la elección del tratamiento más adecuado para cada paciente (141, 142) en la disminución de la aparición de eventos. Se trata de evaluar si el antiguo régimen de talla única para todos los pacientes, quizás debería ser reemplazado por el tratamiento antiagregante individualizado guiado por el genotipado como paradigma de la medicina personalizada.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis fundamental de este estudio es que el genotipado de los polimorfismos *CYP2C19* y *ABCB1* es una herramienta útil en la elección de la doble terapia antiagregante más adecuada (clopidogrel/prasugrel/ticagrelor) y puede disminuir la aparición de eventos cardiovasculares sin el aumento de las hemorragias secundarias en pacientes con enfermedad coronaria sometidos a una ICP con stent, principalmente en el contexto del SCA.

Es decir, individualizar y personalizar la terapia antiagregante por las características farmacogenéticas definiría a los pacientes que mejor responderán a cada tratamiento específico.

El objetivo general de este estudio es comprobar si en pacientes sometidos a ICP con stent, la “estrategia guiada” por el genotipo *CYP2C19* / *ABCB1* en la cual la elección del tratamiento antiagregante se basa en la prueba genética, reduce las tasas de eventos cardiovasculares y sangrados en comparación con una “estrategia no guiada”

> **Objetivo primario:**

Evaluar la utilidad del genotipado en la elección del tratamiento farmacológico, es decir, si el genotipado aumenta la eficacia y seguridad de la terapia antiagregante habitual. Comparar la tasa de eventos cardiovasculares trombóticos (muerte cardiovascular, SCA o ictus) y hemorragias (mayores y/o menores según criterios TIMI) de la terapia antiagregante guiada por genotipado

(clopidogrel o prasugrel / ticagrelor) y sin genotipado (clopidogrel fundamentalmente).

> Objetivos secundarios:

- Comparar la frecuencia de trombosis definida del stent (143) y la necesidad de nueva revascularización urgente no relacionada con la trombosis del stent, con genotipado y sin genotipado.

- Evaluar comparativamente la eficacia y seguridad de clopidogrel y prasugrel / ticagrelor en el grupo de intervención, considerando el posible efecto modificador del polimorfismo de los genes *CYP2C19* y *ABCB1* en la respuesta del clopidogrel. Es decir, comparar la tasa de eventos cardiovasculares isquémicos y de hemorragias de clopidogrel y Prasugrel/ Ticagrelor en condiciones de genotipado.

- Determinar en nuestro medio la prevalencia de los polimorfismos genéticos en una población sana control, y, compararla con la descrita en nuestro entorno y con la población del estudio con cardiopatía isquémica sometida a ICP, mediante las frecuencias alélicas y genotípicas.



MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio experimental no aleatorizado, unicéntrico que incluyó pacientes con enfermedad coronaria sometidos a ICP con stent y que requerían doble terapia antiagregante de 1 a 12 meses.

En el grupo de intervención la elección del tratamiento antiagregante siguió una estrategia guiada por el genotipado de los polimorfismos *CYP2C19/ABCB1* y se comparó con un grupo control retrospectivo con una estrategia de elección del tratamiento antiagregante no guiada. Figura 8.

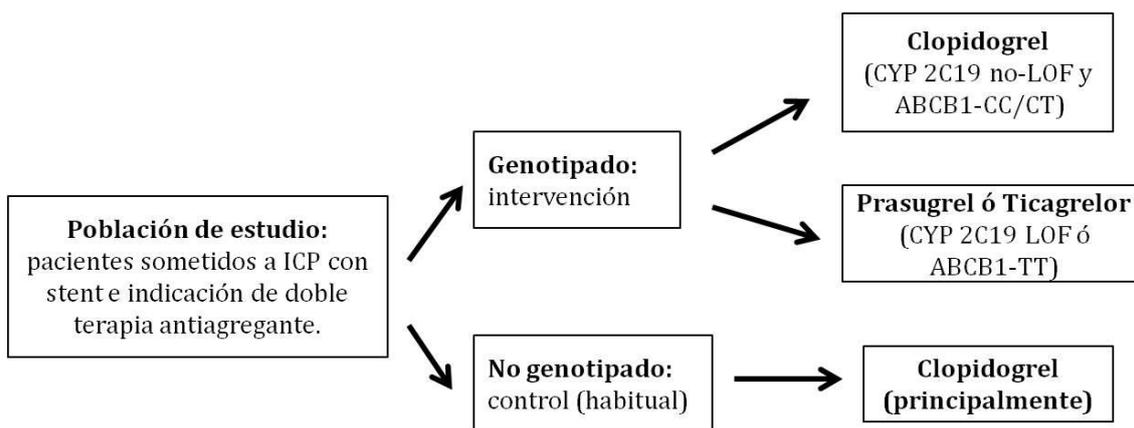


Figura 8. Diseño del estudio

3.2 Población de estudio

Todos los pacientes con enfermedad coronaria sometidos a una ICP con stent y que requerían doble terapia antiagregante de 1 a 12 meses, atendidos en el Hospital Universitario San Cecilio del Complejo Hospitalario Granada, que abarcaba el área sanitaria de los distritos metropolitano y Granada sur con una población potencial de 300.000 personas.

3.2.1 Criterios de inclusión:

- Paciente mayor o igual a 18 años.
- Sometido a una ICP con colocación de stent coronario, principalmente, en el contexto de SCA pero también de cardiopatía isquémica crónica.
- Necesidad de tratamiento antiagregante oral doble, AAS más inhibidor receptor P2Y12 (clopidogrel, prasugrel o Ticagrelor) desde un mes a 12 meses.
- Que firme el consentimiento para participar en el estudio.

3.2.2 Criterios de exclusión:

Los criterios de exclusión principales fueron: presentar contraindicación para las medicaciones del estudio (AAS / clopidogrel / prasugrel y ticagrelor), pacientes que requirieran anticoagulación oral y la presencia de sangrado interno activo o diátesis hemorrágica.

Los criterios de exclusión de forma más detallada se enumeran a continuación:

Exclusión por imposibilidad de guiar el tratamiento por genotipo en el grupo intervención.

- 1) Estar tomando Prasugrel o Ticagrelor con anterioridad al episodio índice.
- 2) Criterios clínicos que a juicio del médico responsable del paciente hagan imprescindible el tratamiento con prasugrel/ticagrelor.
- 3) Retraso en diagnóstico genético superior a 7 días tras la ICP.

Exclusión por riesgo hemorrágico:

- 4) Hemorragia interna activa o historia de diátesis hemorrágica.
- 5) Hallazgos clínicos que, a juicio del investigador, se asocien con un incremento del riesgo hemorrágico.
- 6) Alguno de los siguientes:
 - Ictus hemorrágico previo.
 - Ictus isquémico o AIT (permitido durante el estudio tras estar disponible Ticagrelor).
 - Neoplasia, malformación arteriovenosa o aneurisma intracraneal.
- 7) Plaquetopenia menor de 80.000/mm³.
- 8) Anemia (hemoglobina menor de 9 g/dl).

Exclusión por medicación concomitante:

- 9) Tratamiento anticoagulante oral que no puede ser discontinuado con

seguridad durante el estudio.

10) Inhibidores potentes de CYP3A4 (por ejemplo, ketoconazol, claritromicina, nefazodona, ritonavir y atazanavir).

11) Necesidad de tratamiento diario con AINEs distinto del AAS.

Criterios de exclusión general

12) Mujeres embarazadas o con lactancia.

13) Disfunción hepática severa.

14) Condiciones asociadas con poca adherencia: alcoholismo, enfermedad mental o drogodependientes.

15) Paciente con imposibilidad de seguimiento reglado por residencia fuera del área.

16) Intolerancia o alergia a aspirina, clopidogrel o ticagrelor.

17) Cirugía valvular prevista a corto plazo (<1-3 meses).

3.2.3 Tamaño de la muestra, muestreo y marco del estudio

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó en base al subestudio genético TRITON-TIMI-38 publicado por Mega et al (60) en el que los pacientes tratados con clopidogrel sin variación genética tuvieron una tasa de eventos cardiovasculares del 6,3% en comparación con aquellos con variaciones genotípicas, que alcanzaron un porcentaje de eventos del 13,6%. Para conseguir una potencia del 80,0% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis

nula $H_0:p_1=p_2$ mediante una prueba χ^2 bilateral para dos muestras independientes, teniendo en cuenta que el nivel de significación es 5%, sería necesario incluir 263 sujetos en cada grupo, totalizando 526 pacientes en el estudio.

En el muestreo fueron evaluados todos los pacientes consecutivos sometidos a ICP, e incluidos en el estudio si cumplían los criterios de inclusión y no los de exclusión.

El marco del estudio, que constituyó la población accesible, fue tanto la unidad coronaria de cuidados intensivos como la sala de hospitalización de cardiología.

3.3 Definición de la Intervención

Todos los pacientes recibieron el tratamiento habitual requerido previo a la ICP e implante de stent a criterio del médico responsable del paciente, incluyendo AAS 100 mg/día de forma indefinida.

En cuanto al tratamiento bloqueante del receptor P2Y₁₂, dentro del grupo de intervención guiado por genotipado, tras la ICP los pacientes portadores de 1 o más alelos con LOF en CYP2C19 (*CYP2C19* * 2, * 3) y/o portadores del *ABCB1* TT (considerados “clopidogrel resistentes”) recibían los nuevos antiagregantes bloqueantes del receptor P2Y₁₂: prasugrel preferentemente (5 o 10 mg día ajustado por peso y edad) o ticagrelor 90 mg cada 12 horas (este último fue aprobado durante el transcurso del estudio y centrado fundamentalmente para los

pacientes con antecedentes de ictus). Por el contrario, los no portadores de estos alelos (considerados “clopidogrel sensibles”), recibían clopidogrel 75 mg al día. En los cambios de tratamiento (clopidogrel a Prasugrel/Ticagrelor, o de estos a clopidogrel), la administración de dosis de carga antes de comenzar con la dosis de mantenimiento fue opcional.

En el grupo control retrospectivo sin genotipado, los pacientes recibieron el tratamiento antiagregante basado en la práctica clínica habitual, que en el momento del estudio era clopidogrel 75 mg/día predominantemente. Figura 8.

3.4 Procedimientos del estudio y seguimiento: protocolo del estudio.

El itinerario diseñado para el reclutamiento de pacientes fue, por un lado, para los “pacientes diagnosticados de SCA” sometidos a ICP con stent, ingresados en la unidad coronaria de cuidados intensivos o en sala de cardiología; por otro lado, para los pacientes con “enfermedad coronaria estable” sometidos a ICP, seleccionados en planta de hospitalización tras el implante de stent.

En ambos se verificaba si cumplían con los criterios de selección del estudio. Tras obtener el consentimiento informado para participar en el estudio, en el grupo intervención, la prueba genética se realizaba lo más precozmente en relación con la ICP. El circuito diseñado consistía en la toma diaria de cuatro muestras de saliva por paciente con un hisopo y por personal de enfermería o farmacia, a la cabecera del paciente. Las muestras eran conservadas en frío,

custodiadas por el servicio de Farmacia y enviadas por transporte reglamentario al centro de investigación GENYO (Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica) dos días por semana, lunes y jueves, quien tras el procesado de la muestra obtenía el resultado genotípico a las 24 horas de la recepción, martes y viernes, respectivamente. El resultado era comunicado de inmediato al servicio de Farmacia del hospital quien informaba al servicio de Cardiología de la recomendación farmacoterapéutica para cada paciente guiado por el genotipo, dejando registro en la historia clínica del paciente. A partir de ese momento se prescribía el tratamiento adecuado para cada paciente (clopidogrel/ prasugrel/ticagrelor), que fue suministrado por parte de farmacia del hospital durante el tiempo prescrito de la doble antiagregación

Toda la información sobre el historial médico del episodio índice se registró en un formulario de recogida de datos informático. Las visitas para evaluar los objetivos de eficacia y seguridad del estudio, así como los eventos adversos durante el seguimiento de un año fueron planificados para el alta hospitalaria y los meses 1, 3, 6 y 12 tanto por parte de cardiología como por farmacia. Los parámetros fueron registrados por los investigadores utilizando los archivos de pacientes del hospital, registros de farmacia y cuestionarios de pacientes. Se solicitó a los pacientes que rellenaran un cuestionario cada 3 meses después de la ICP, para obtener información sobre los cambios en el uso de fármacos antiagregantes, la co-medicación, el cumplimiento de los fármacos y los eventos adversos. Durante el curso del trabajo de investigación se realizó un análisis intermedio de seguridad para comprobar la marcha del estudio en cuanto a eventos. La duración prevista del estudio fue de 3 años incluyendo el

reclutamiento de pacientes y la valoración de los resultados. Figura 9.

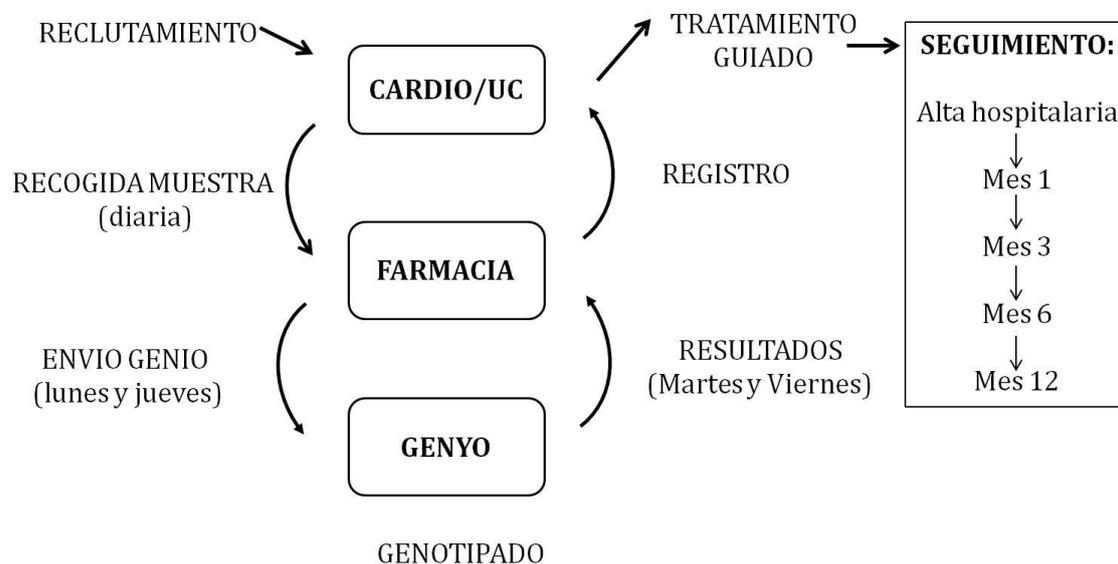


Figura 9. Circuito del estudio

3.5 Variables del estudio

Las **variables dependientes** relacionadas con el resultado clínico que queremos demostrar:

1) El objetivo principal de eficacia: el combinado de muerte cardiovascular, SCA o ictus no fatal. Cada una de estas variables por separado son definidas como:

- Muerte cardiovascular: cualquier muerte por causa cardiovascular demostrable o muerte no claramente atribuible a una causa no cardiovascular.

- SCA: síntomas clínicos compatibles con isquemia miocárdica aguda y que incluye a) AI: sin elevación de troponinas con tres presentaciones principales: angina de reposo > 20 minutos, angina de inicio en el último mes o progresiva. , b)

IAMSEST: elevación de troponinas sin elevación persistente del segmento ST y c)
IAMCEST: elevación persistente del segmento ST en el electrocardiograma con troponina positiva.

- Ictus no fatal: déficit neurológico de 24 horas o más con confirmación por TAC o RMN.

2) Otras variables dependientes secundarias:

- Trombosis definida de stent: oclusión total o trombo visible dentro del stent o en los 5 mm del stent en presencia de un síndrome clínico isquémico agudo en las 48 h.

- Necesidad de revascularización urgente no relacionada con la trombosis del stent.

- Variables de seguridad: Hemorragias no relacionadas con CABG, usando las definiciones del ensayo TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction). 1- Hemorragias TIMI mayores (a) de riesgo vital: fatales, hemorragias intracraneales sintomáticas, causantes de descenso de hemoglobina de al menos 5 g/dl, requiriendo intervención quirúrgica, inotrópicos intravenosos o trasfusión de 4 o más unidades; b) sin riesgo vital: discapacidad sustancial, hemorragia intraocular causante de pérdida de visión o precisen al menos 2 unidades de trasfusión). 2- Hemorragias menores: Cualquier otra hemorragia que causara interrupción de la medicación del estudio.

VARIABLES INDEPENDIENTES:

> VARIABLES INDEPENDIENTES RELACIONADAS CON LAS CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES:

- Edad, sexo, índice de masa corporal, raza/etnia (caucásica, asiática, negra...)

- Factores de riesgo: dislipemia, hipertensión arterial, diabetes, tabaco.

- Enfermedades previas: angina, IAM, insuficiencia cardíaca, ictus, arteriopatía periférica, insuficiencia renal (creatinina > 2, diálisis), EPOC, angioplastia previa, cirugía coronaria, neoplasia.

> VARIABLES INDEPENDIENTES RELACIONADAS CON LA PATOLOGÍA:

- Diagnóstico principal: SCASEST, SCAEST, angor estable, insuficiencia cardíaca; nº de coronarias principales enfermas; nº de coronarias revascularizadas; FEVI(%); puntuación GRACE intrahospitalaria y CRUSADE

- Tipos de genotipos: *CYP2C19**2 (1/1, 1/2, 2/2), *CYP2C19**3 (1/1, 1/3, 3/3), *ABCB1* (CC, CT o TT)

- Valores analíticos al inicio y al final del estudio: creatinina, hemoglobina, colesterol total y LDL

- Tratamiento recibido: Trombolisis, angioplastia primaria, angioplastia de rescate, AntiIIb/IIIa, tratamiento anticoagulante, antiagregante inicial (clopidogrel, prasugrel, ticagrelor), tipo stent (stent normal, stent recubierto), nº total de stent, suma (mm) de stent, estatinas, betabloqueantes, IECA, inhibidores de la bomba de

protones (IBP).

Todas las variables descritas fueron introducidas en una base de datos para el análisis posterior.

3.6 Genotipado *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* y *ABCB1*: Recogida y tratamiento de la muestra biológica.

Una muestra de saliva tomada con hisopo fue suficiente para la obtención y aislamiento del ADN. La muestra era enviada al centro de investigación GENYO como se ha descrito previamente.

La recolección de células de la mucosa bucal y los procedimientos de extracción de ADN se llevaron a cabo de acuerdo con el método detallado en Freeman et al. (144), un protocolo no orgánico (proteinasas K) con algunas modificaciones descritas por Gómez-Martín A. et al. (145).

Una vez extraído el material genético se llevan a cabo el genotipado de los polimorfismos *CYP2C19*2* (rs4244285), *CYP2C19*3* (rs4986893) y *ABCB1* 3435 C>T (rs1045642) mediante la plataforma de discriminación alélica TaqMan® (Life Technologies, Foster City, CA, EE.UU.). Para una descripción en detalle de la técnica se remite a ver el ANEXO I.

El análisis de genotipado se realizó utilizando el software SDS v.2.4. Las frecuencias de los genotipos de cada uno de los SNP fueron calculadas y las distribuciones fueron probadas para el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0,05$). El principio de HWE determina qué frecuencias deben observarse en la

población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo (152).

Como control de calidad, cada serie de amplificaciones incluyeron tres controles negativos sin plantilla de ADN (NTC) para probar la contaminación del ADN. Cada ejecución también incluyó tres controles positivos con muestras de los genotipos conocidos en cada SNP analizado que habían sido previamente confirmados por la secuenciación del ADN.

Esta tecnología nos permitió hacer una discriminación alélica del polimorfismo, indicándonos el porcentaje de cada alelo en la muestra. El resultado genotípico era comunicado al servicio de Farmacia del hospital quien informaba al servicio de Cardiología de la recomendación farmacoterapéutica para cada paciente.

Las muestras de saliva fueron gestionadas a través del Biobanco para Investigación del HU Complejo Hospitalario de Granada, perteneciente a la Red Nacional de Biobancos (Proyecto RD09/0076/00148), asegurando así, el tratamiento integral de las muestras y datos asociados de acuerdo a la Ley 14/2007 de 3 de julio de Investigación biomédica, Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y

obligaciones en materia de información y documentación clínica.

Previo a la realización del estudio experimental, para determinar la prevalencia de los polimorfismos genéticos en *CYP2C19* y *ABCB1* en la población normal andaluza y compararla con otras poblaciones, como paso previo para implantar esta determinación en la práctica clínica diaria, se seleccionaron al azar 100 controles del banco andaluz de DNA a los que se genotipo los polimorfismos en estudio y se comparó con la publicada en estudios con otras poblaciones y con la de nuestro estudio.

3.7 Análisis estadístico.

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de las características basales de los sujetos de estudio. Se calculó medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, y frecuencias absolutas y relativas para las cualitativas.

Se realizó el test de Shapiro Wilks para comprobar la normalidad de las variables numéricas, y determinar la utilización de test paramétricos/no paramétricos. Para comprobar la homogeneidad de los grupos se realizó un análisis bivalente de comparación de las principales variables recogidas entre los grupos de estudio (genotipado/no genotipado). Se utilizaron el test chi-cuadrado de Pearson o Fisher para las variables cualitativas, t de Student o Mann-Whitney para las cuantitativas.

La comparación de los grupos de tratamiento con respecto a los criterios de

valoración de eficacia y seguridad se llevó a cabo utilizando el análisis del tiempo hasta el primer evento mediante el método de Kaplan-Meier. La influencia potencial de los factores de riesgo basales y las interacciones se evaluaron de forma exploratoria utilizando el modelo de regresión de Cox multivariado con el método de “backward” que incluyó a las variables con diferencias significativas en el análisis univariado. El análisis para las comparaciones entre ambos grupos de tratamiento (genotipado y no genotipado) se realizó mediante el Hazard Ratio (HR) de forma global y estratificado por los diferentes componentes del objetivo principal y de otros objetivos secundarios: muerte no CV, revascularización urgente no relacionada con trombosis de stent y trombosis de stent, y, hemorragias.

El mismo análisis se realizó para contrastar posibles diferencias entre la eficacia y seguridad del clopidogrel y los nuevos antiagregantes dentro del grupo genotipado. Para evaluar la homogeneidad en la distribución de los genotipos se calculó el HWE para los distintos polimorfismos, mediante el test de chi-cuadrado de Pearson.

Todos los intervalos de confianza se calcularon con un nivel de confianza del 95%, y todas las pruebas de hipótesis se llevaron a cabo utilizando un valor de $p < 0,05$ como evidencia de significación. Los datos se analizaron con el software estadístico R.

3.8 Aspectos éticos de la investigación.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del centro hospitalario (anexo IV) y se llevó a cabo de acuerdo con los requerimientos expresados en la:

*Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica.

*Orden ministerial SAS/3470/2009, por la que se publican las directrices sobre estudios pos-autorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.

* Declaración de Helsinki (revisión de Seúl, Octubre de 2008). Ésta define los principios que fueron respetados escrupulosamente por todas las personas implicadas en esta investigación.

* El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustó a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

*El estudio ha sido registrado como ensayo clínico en el “Registro de Ensayos Clínicos de la Unión Europea” con el número EUDRACT: 2016-001294-33, que contiene información sobre los ensayos clínicos de intervención con medicamentos realizados en la Unión Europea o el Espacio Económico Europeo.

Hoja de información y formulario de consentimiento

A cada sujeto que se le propuso entrar en el estudio se le entregó un

documento escrito denominado "Hoja de información al paciente", que contenía la información relevante y necesaria para que el paciente pudiera decidir acerca de su participación en el estudio (hoja modelo BIOBANCO). ANEXO II.

El investigador responsable del estudio informó al sujeto sobre la naturaleza voluntaria de su participación y explicó que no suponía ningún cambio ni en su tratamiento ni en su atención médica respecto a los que recibiría de no participar. El investigador contestaba a sus dudas y preguntas y, de acuerdo con la normativa vigente, obtuvo el consentimiento escrito del sujeto, o en su defecto de forma oral ante testigos independientes del equipo investigador. Se aclaró completa e inequívocamente que el paciente era libre de rechazar la participación en el estudio y que podía revocar su consentimiento en cualquier momento y por cualquier razón, sin que se derive para el paciente perjuicio alguno, ni se le niegue tratamiento o seguimiento clínico por parte del investigador. Los investigadores conservan el consentimiento informado firmado y documentado en la historia clínica.

Confidencialidad de los datos

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos del estudio, sólo tenían acceso a los mismos, el investigador y su equipo de colaboradores y las autoridades sanitarias pertinentes. Los datos del investigador y del estudio fueron introducidos en un fichero, que se trató conforme a lo que dispone la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, exclusivamente para el desarrollo y buen fin del estudio.



RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes y tratamiento

Entre abril de 2010 y septiembre de 2013 fueron tratados 818 pacientes, sometidos a una ICP con implante de stent. De ellos, 79 pacientes no cumplían con los criterios de selección (figura 9). Los principales criterios de exclusión fueron la necesidad de tratamiento anticoagulante oral, presencia de diátesis hemorrágica, alergias y cirugía valvular próxima, todos ellos balanceados entre los dos grupos de tratamiento. Sólo 9 pacientes en el grupo guiado por genotipado, no recibieron el tratamiento recomendado que les correspondía, a juicio del médico tratante por criterios clínicos (6 de ellos recibieron nuevos antiagregantes y 3 clopidogrel). El porcentaje de pérdidas durante el seguimiento fue del 2,4%, principalmente por pacientes que fueron atendidos en el hospital que, o bien eran desplazados de otras áreas sanitarias, o bien, se trasladaron a otras áreas sanitarias tras el procedimiento, por lo que fueron excluidos del análisis. Figura 10.

Finalmente 719 pacientes fueron incluidos en el estudio, 402 individuos en el grupo de control (que abarcó de abril 2010 a marzo 2012, 24 meses) y 317 pacientes en el grupo de intervención (de abril 2012 a septiembre 2013, 18 meses). La frecuencia de inclusión de pacientes en ambas ramas del estudio fue similar (entorno a 17 pacientes al mes) y aunque se habían estimado dos años de período de reclutamiento en cada grupo, este fue el período en el retrospectivo, sin embargo en el grupo prospectivo se detuvo la inclusión después de 18 meses tras

superar ampliamente el tamaño muestral.

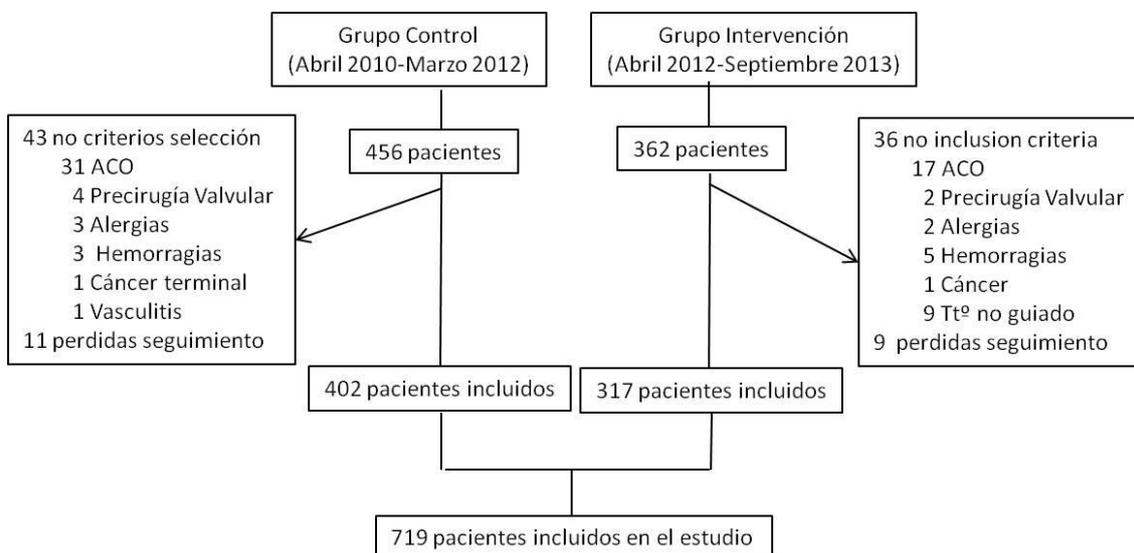


Figura 10. Perfil del estudio

4.2 Características basales.

Las características basales de los pacientes fueron muy parecidas en ambos grupos (grupos de intervención y de control) (tabla 4).

El diagnóstico principal de indicación de la ICP en la mayoría de los pacientes fue por SCA, 86,1% en el grupo de intervención y 86,3% en el grupo control. Considerados globalmente fueron: IAMCEST 296 pacientes (47%), IAMSEST 190 (31%) y AI 134 (22%). En la estratificación por riesgos del SCA, el 80% tenían nivel intermedio-alto de riesgo isquémico (puntuación GRACE ≥ 109) y el 16% tenían un riesgo alto de sangrado (puntuación CRUSADE ≥ 41), distribuidos

de forma similar por ambos grupos de tratamiento. El resto de indicaciones de ICP supuso sólo el 13,8% y fueron por AE 80 pacientes e insuficiencia cardiaca isquémica 19 pacientes.

Tabla 4. Características “clínicas” basales de pacientes por grupos

	Grupo intervención (n=317) (%)	Grupo control (n=402) (%)	Valor p
Sexo (mujer)	79 (24.9)	89 (22.1)	0.38
Edad (media y dt)	64.1 ±12.1	64.6±11.5	0.54
IMC (media y dt)	28.2 ±4.9	28.6 ±4.7	0.61
Presentación clínica			
SCA	273 (86.1)	347 (86.3)	0.93
IAMCEST	129 (41)	168 (42)	
IAMSEST	91 (29)	99 (25)	
AI	53 (17)	80 (20)	
No-SCA	44 (14)	55 (14)	0.88
AE	35 (11)	45 (11)	
ICC	9 (2.8)	10 (2.5)	
Factores de riesgo			
Diabetes mellitus	112 (35.3)	149 (37.1)	0.66
Hipertensión arterial	194 (61.2)	256 (63.7)	0.50
Dislipemia	184 (58)	228 (56.7)	0.72
Fumadores	82 (26)	108 (27)	0.71
SCA previo	43 (13.6)	60 (14.9)	0.60
ACV previo	16 (5)	28 (7)	0.28
Creatinina>2 mg/dl	10 (3.2)	14 (3.5)	0.81
ICP previa	25 (7.9)	26 (6.5)	0.46
CABG previo	2 (0.6)	4 (1)	0.59
Otras variables clínicas			
GRACE score ≥109	234 (73.8)	300 (74.6)	0.52
CRUSADE score ≥31	81 (25.6)	100 (25)	0.73
FEVI (media, dt)	54.5±10.1	55.4±10.9	0.50
Enfermedad coronaria			0.33
1 vaso	143 (45)	178 (44.4)	
Tronco coronario	16 (5.1)	17 (4.2)	
Revascularización Completa	209 (65.9)	272 (67.7)	0.61

No hubo diferencias importantes entre los grupos con respecto a las “características clínicas” basales (tabla 4). Considerados globalmente, la edad

media de los dos grupos fue 64 ± 11 años y el 23% eran mujeres. El porcentaje de diabéticos fue del 36%, HTA 62% y fumadores 32%. Habían tenido un infarto previamente el 14,3%, recibido ICP el 7% y cirugía coronaria el 0,8%. El porcentaje de comorbilidades presentes al inicio fue: 8,9% enfermedad pulmonar crónica, 7% arteriopatía periférica, 6,1% ictus y 3,3% insuficiencia renal crónica (definida por una creatinina > 2 mg/dl). La FEVI media fue $55\pm 10\%$ y la extensión de la enfermedad coronaria considerada por el número de vasos principales enfermos fue: un vaso 44,9%, dos vasos 30,9%, tres vasos 19,6% y enfermedad de tronco 4,6%.

En cuanto a las “características terapéuticas iniciales” (tabla 5), si hubo algunas diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio. En ambos grupos la revascularización percutánea fue principalmente de un solo vaso en el 66,8% o de dos vasos en otro 26,7%, y la revascularización se consideró completa en el 67% de los pacientes. Tampoco hubo diferencias en el número de stent por paciente (de media $1,94\pm 1,2$, con un mínimo de 1 y un máximo de 8 stent) ni en la suma en milímetros (mm) de la longitud de stent por paciente ($37,3\pm 25$ mm). Sin embargo, más pacientes en el grupo de intervención recibieron stents liberadores de fármacos, 76% frente a sólo el 59,2 % en el grupo control ($p=0,0001$), aunque el 98% de estos stent en ambos grupos fueron stent de segunda generación.

Igualmente hubo un porcentaje mayor de angioplastia primaria en el grupo intervención 7,3% frente al 1,7% en el de control ($p=0,001$), aunque el porcentaje de trombolisis (20,8% frente a 24,9%), angioplastias de rescate (9,5% frente a

9,7%), uso de inhibidores del receptor IIb/IIIa (8,8% frente 9,2%) y bivalirudina (11,7% frente a 16%) no mostraban diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Tabla 5. Características "terapéuticas" basales de pacientes por grupos

	Grupo intervención (n=317) (%)	Grupo control (n=402) (%)	Valor p
Tratamiento inicial			
Trombolisis	66 (20.8)	100 (24.9)	0.20
ICP primaria	23 (7.3)	7 (1.7)	0.001
Angioplastia rescate	30 (9.5)	36 (9.7)	0.91
Bivalirudina	37 (11.7)	64 (16)	0.21
Anti-IIb-IIIa	28 (8.8)	37 (9.2)	0.86
Stent recubierto drogas	241 (76)	238 (59.2)	0.0001
Nº stent/paciente (media y dt)	1.94±1.2	1.94±1.18	0.90
Longitud stent mm(media y dt)	37.3 ±24.2	37.2±25.2	0.78
Días en UC (media y dt)	1.76±1.8	1.8±2.1	0.69
Otros tratamientos farmacológicos			
b-bloqueantes	276 (87)	358 (89)	0.16
IECAs/ARAII	276 (87)	357 (88)	0.70
Estatinas	298 (94)	384 (95.5)	0.36
IBP	280 (88)	217 (54)	0.0001

Por último, en cuanto al "tratamiento farmacológico al alta" fue similar respecto al porcentaje de uso de betabloqueantes (86,5%), IECAs/ARAII (88%) y estatinas (94,7%). Sin embargo, más pacientes en el grupo de intervención que en el grupo de control fueron tratados con IBP (88% frente a 54% respectivamente, $p=0,0001$), aunque de ellos tratados con omeprazol a la vez que clopidogrel sólo 6 pacientes (3,2%) en el grupo intervención y 11 pacientes (2,9%) en el grupo control.

4.3 Tratamiento antiagregante.

La mediana de duración de la terapia antiplaquetaria doble fue de 365 días, completando el año de tratamiento el 82% de los pacientes. Sólo el 7,5% recibió tratamiento doble durante un mes, otro 7,5% entre 1 y 6 meses, y el 3% de los pacientes entre 6 y 12 meses.

En el grupo de intervención (n=317), 130 pacientes (el 41%) portaba genotipo de riesgo en alguno de los genes *CYP2C19* y/o *ABCB1*: 125 pacientes recibieron prasugrel y 5 pacientes recibieron ticagrelor. 187 pacientes (el 59%) no portaba genotipo de riesgo en ninguno de los genes *CYP2C19* ni *ABCB1* y recibieron clopidogrel. El retraso medio de tiempo entre la implantación del stent y el resultado de la prueba genética fue de 2,9 días ($\pm 2,7$): los pacientes ingresados en la unidad coronaria (el 61%) el retraso medio fue de 3,5 días frente a 1,7 días en los que ingresaban en planta. En el momento del resultado genético, 119 pacientes en tratamiento con clopidogrel se cambiaron a los nuevos inhibidores P2Y12 y 11 que ya los estaban recibiendo continuaron con ellos; 15 pacientes que recibían los nuevos antiagregantes se cambiaron a clopidogrel y 172 pacientes continuaron con clopidogrel que tomaban.

El grupo control (n=402) fue tratado con clopidogrel en su mayoría, sólo 27 pacientes (7%) recibió como tratamiento prasugrel. El protocolo del estudio se llevó a cabo como estaba previsto, excepto por el hecho de que 5 pacientes recibieron ticagrelor en el grupo de intervención, ya que este fármaco fue aprobado durante el curso del estudio.

4.4 Evaluación clínica genotipado frente a no genotipado

Objetivos de eficacia

Se produjo la variable principal de muerte cardiovascular, SCA o ictus en 32 pacientes (10,1%) del grupo genotipado y en 59 pacientes (14,1%) del grupo control (HR para el grupo genotipado: 0,63; intervalo de confianza [IC] del 95%: de 0,41 a 0,97; $p = 0,037$; y tras ajustar por el análisis multivariado HR: 0,58; IC del 95%: de 0,38 a 0,91; $p = 0,02$). Figura 11.

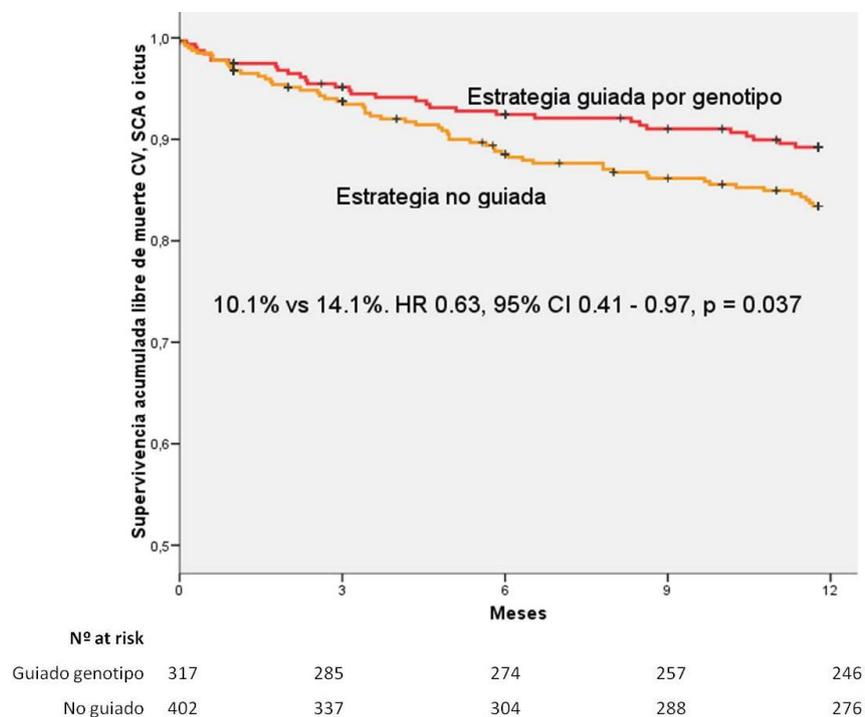


Figura 11. Supervivencia Kaplan-Meier para la variable principal de eficacia

En el análisis multivariante se incluyó además del genotipado, la edad, diabetes, IMC, tipo de stent, número de stent por paciente, la angioplastia primaria y el uso de IBP. Sólo la edad y el número de stent junto al genotipado fueron predictores independientes de la variable principal, y el índice de masa corporal mostraba una tendencia a la significación (figura 12). El modelo predictivo para el evento primario obtenido, con un índice de concordancia igual a 0.64, fue:

$$\lambda(t) = \lambda_0(t) e^{(-0.537 * \text{genotipo} + 0.051 * \text{numstent} + 0.032 * \text{edad} + 0.045 * \text{IMC})}$$

Muerte CV/SCA/Ictus

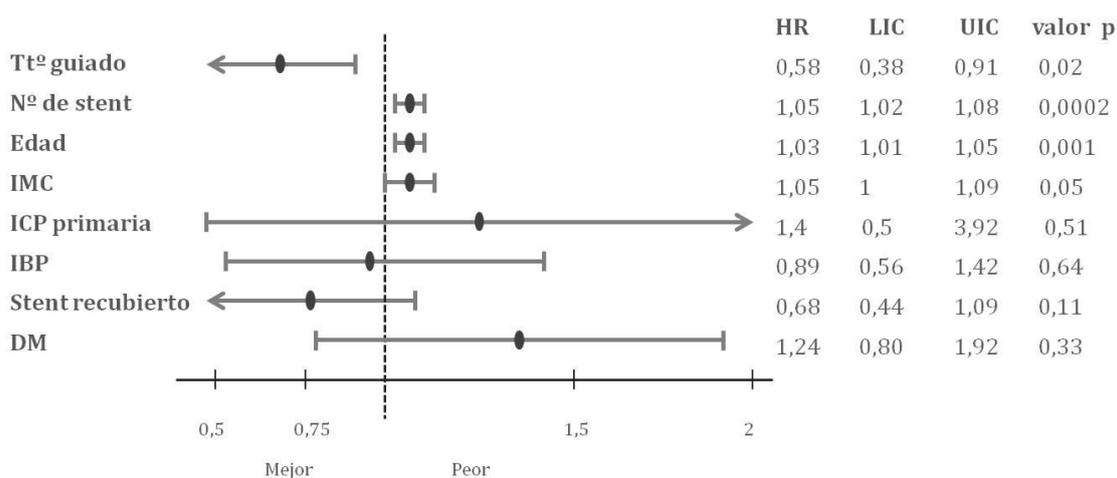


Figura 12. Análisis multivariante para predictores de la variable principal

También se analizaron los riesgos para cada uno de los componentes de la variable principal. En total hubo 2 muertes (0,6%) en el grupo genotipado y 12 (3%) en el grupo control que se debieron a causas cardiovasculares (HR 0,19; IC del 95%: 0,04-0,86, p = 0,03). En el grupo genotipado tuvieron SCA 27 pacientes

(8,5%) frente a 41 (10,2%) en el control (HR 0,71; IC del 95%: 0,47-1,26; p = 0,31). El ACV ocurrió en 2 pacientes (0,6%) en el grupo genotipado frente a 8 (2%) en el control (HR 0,32; IC del 95%: 0,07 - 1,49; p = 0,12) (tabla 6).

No hubo diferencias significativas en otras variables secundarias del estudio. Murieron de causa no cardiovascular 2 pacientes (0,6%) en el grupo genotipado y 1 (0,1%) en el control (HR 2.4; IC 95%: 0.21-26.5; p= 0.47). Hubo 1 caso de trombosis aguda del stent en el grupo de intervención (0.3%) y otro en el grupo control (0.2%) (HR: 1.27; IC del 95%: 0.08-20.2; p= 0.87). La revascularización urgente no relacionada con la trombosis del stent ocurrió en 12 pacientes (3,8%) del grupo genotipado frente a 22 pacientes (5,5%) en el control (HR 0.63; IC 95%: 0.31-1.28; p= 0.20). Tabla 6.

Tabla 6. Asociación de los grupos con los objetivos primario y secundarios

Objetivos de eficacia	Grupo Intervención (n=317)	Grupo Control (n=402)	HR (95%IC)	Valor-p
Muerte CV, SCA, ictus	32 (10.1%)	59 (14.1%)	0.63 (0.41-0.97)	0.037
Muerte CV	2 (0.6%)	12 (3%)	0.19(0.04-0.86)	0.03
SCA	27 (8.5%)	41 (10.2%)	0.71(0.47-1.26)	0.31
Ictus	2 (0.6%)	8 (2%)	0.32 (0.07-1.49)	0.12
Muerte no CV	2 (0.6%)	1 (0.2%)	2.41(0.21-26.5)	0.47
Revascularización urgente no relacionada con trombosis stent	12 (3.8%)	22 (5.5%)	0.63 (0.31-1.28)	0.20
Trombosis de stent	1 (0.3%)	1 (0.2%)	1.27 (0.08-20.2)	0.87

Objetivos de seguridad

En cuanto a la seguridad, no hubo diferencias en hemorragias TIMI mayores y menores entre los dos grupos (4,1% vs 4,7%, HR 0,80, IC 95% 0,39-1,63), $p = 0,55$). En los pacientes del grupo genotipado, 6 (1,9%) tuvieron al menos una hemorragia TIMI mayor no relacionada con CABG, comparado con 10 pacientes (2,5%) en el grupo retrospectivo (HR 0,70; IC 95%: 0,25-1,94; $p=0,50$). Figura 13.

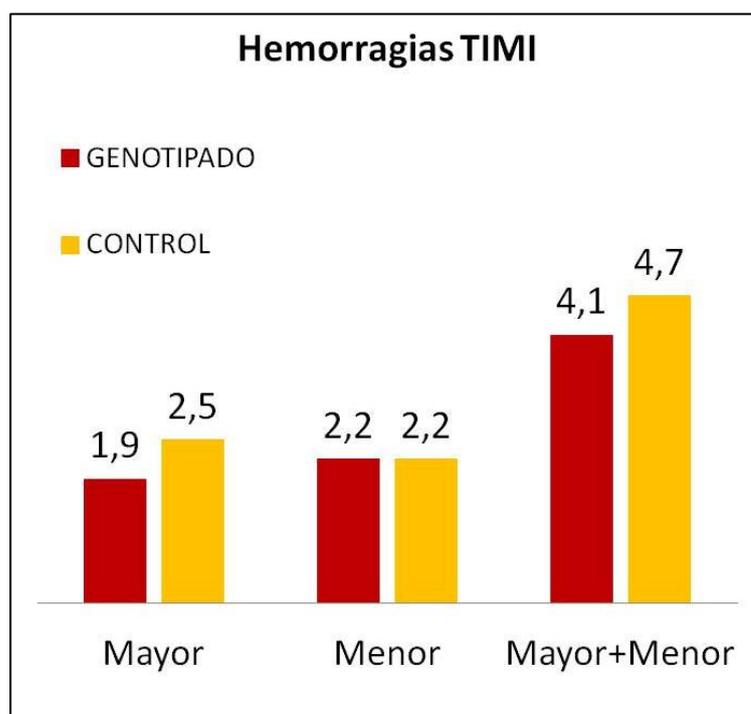


Figura 13. Porcentaje de hemorragias TIMI no relacionadas con CABG

Hubo una mayor tasa de hemorragias mayores de riesgo vital en el grupo genotipado (1,6% frente a 0,7%, $p=0,29$) y sin riesgo vital en el retrospectivo

(0,3% frente a 1,7%; $p=0,12$) pero sin alcanzar en ninguno de los casos significación estadística, con sólo una hemorragia fatal en el grupo retrospectivo. Las hemorragias TIMI menores fueron 7 (2,2%) en el grupo genotipado frente a 9 (2,2%) en el grupo retrospectivo (HR 0.93; IC 95%, 0.35-2.49, $p=0.88$). Tabla 7.

Tabla 7. Hemorragias TIMI no relacionadas con CABG por grupos.

Objetivos de seguridad	Grupo Intervención (n=317)	Grupo Control (n=402)	HR (95%IC)	Valor- p
Hemorragia TIMI mayor	6 (1,9%)	10 (2,5%)	0,70(0,25-1,94)	0,5
Por instrumentación	1(0,3%)	2(0,5%)		
Espontánea	2(0,6%)	4(0,9%)		
Por traumatismo	3(0,9%)	4 (0,9%)		
Hemorragias de riesgo vital	5(1,5%)	3(0,8%)	2,1(0,5-8,9)	0,29
Hemorragias Intracraneales	2 (0,6%)	2(0,5%)	1,27(0,18-9,1)	0,6
Hemorragia fatal	0	1(0,2%)	-	-
Hemorragia TIMI mayor y menor	13 (4,1%)	19(4,7%)	0,80(0,39-1,63)	0,55

Hubo una tendencia a mayor presentación de otras hemorragias sin criterios de gravedad TIMI (equimosis, epistaxis, gingivorragias...) en el grupo genotipado que en el control (13,6% vs 9,7%, $p=0,10$)

Considerado de forma conjunta, el efecto neto de eficacia y seguridad mostró una tendencia favorable para el grupo genotipado (13,9% vs 18,4%, HR 0,69, IC del 95% 0,48-1,01, $p = 0,058$). Figura 14.

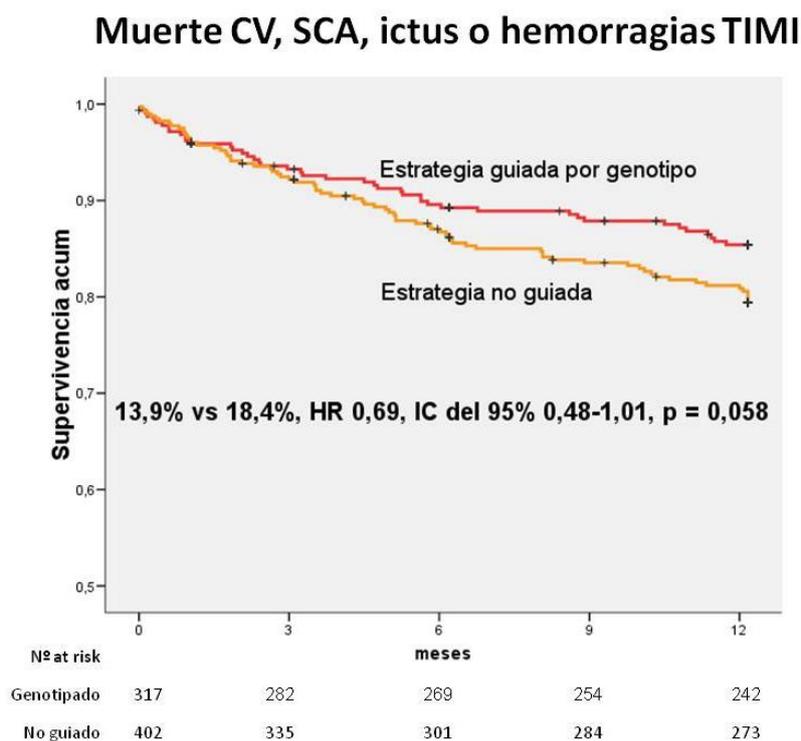


Figura 14. Kaplan-Meier para el efecto neto variables de eficacia y seguridad.

4.5 Evaluación clínica dentro del grupo genotipado

En cuanto a los resultados de las diferentes terapias antiagregantes utilizadas en condiciones de genotipado, no hubo diferencias en eventos cardiovasculares ni hemorragias entre los pacientes sensibles tratados con clopidogrel y los pacientes resistentes tratados con los nuevos antiagregantes.

La variable principal de mortalidad, SCA e ictus ocurrió en 17 pacientes con clopidogrel (9,1%) y en 15 pacientes con los nuevos antiagregantes (11,5%) con un HR de 0.76 (IC 95%: 0.38-1.53, p = 0,44). Figura 15. Hubo un solo caso de

trombosis de stent en un paciente resistente a clopidogrel antes del inicio del nuevo antiagregante. La revascularización urgente no relacionada con la trombosis del stent se realizó en 8 pacientes con clopidogrel (4,2%) y en 4 pacientes con los nuevos antiagregantes (3,1%) con un HR: 1.37; 0.41-4.55; p=0,6.

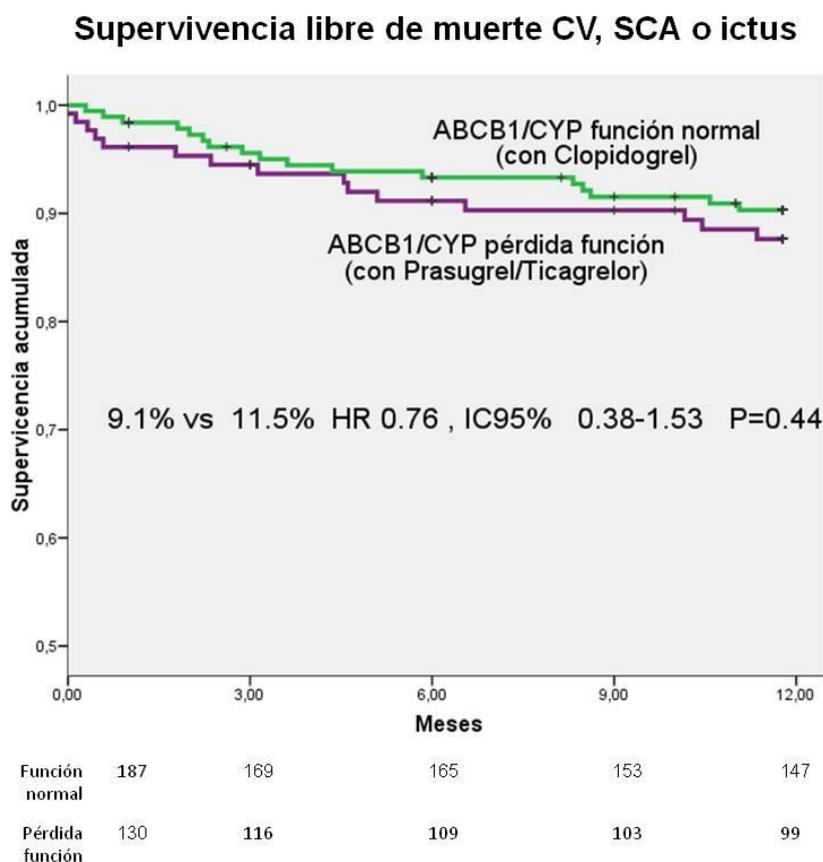


Figura 15. Kaplan-Meier de la variable principal de eficacia en condiciones de genotipado

Las hemorragias TIMI mayores y menores no relacionadas con CABG en el grupo tratado con clopidogrel frente a nuevos antiagregantes fue similar: de forma

conjunta 3,7% vs 4,6%; HR: 0.80, IC 95% 0.27-2.38, p = 0,69; las hemorragias mayores 2,1% vs 1,5% (p= 0,70); la hemorragia menor 1,6% vs 3,6% (p=0,38) y otras hemorragias sin criterios TIMI 11,8% vs 16,2% (p=0,26). Figura 16.

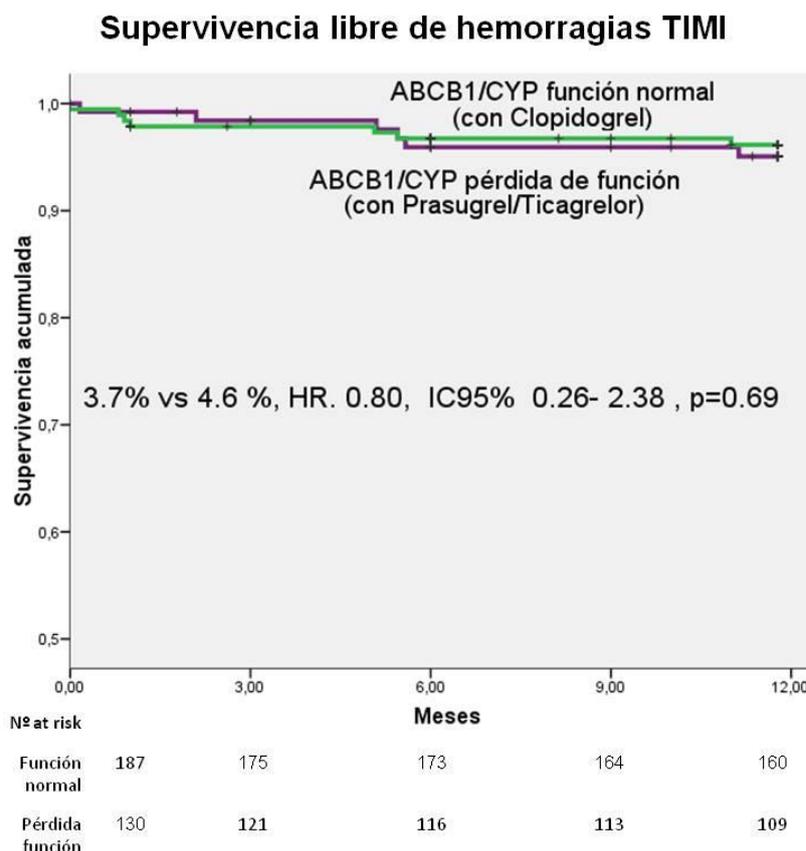


Figura 16. Kaplan-Meier para la variable de seguridad en condiciones de genotipado

4.6 Frecuencias genotípicas *CYP2C192, *CYP2C19**3 and *ABCB1***

Los pacientes del grupo de intervención fueron genotipados para el polimorfismo *CYP2C19* * 2 y la distribución fue * 1 / * 1: 72.87%, * 1 / * 2: 24.29% y * 2 / * 2: 2.84% (no-LOF = 72.87% Y LOF = 27,13%). Ningún paciente llevaba el

alelo *CYP2C19* * 3. Con respecto al polimorfismo *ABCB1* 3435 C> T, la distribución del genotipo fue CC 29,02%, CT 51,42% y TT 19,56% (sin riesgo= 80,44% y en riesgo= 19,56%). Las frecuencias genotípicas de ambos genes estaban en HWE (*CYP2C19**2 p = 0,41, y *ABCB1* p = 0,50) y se confirmaron las frecuencias reportadas (51, 60). Figura 18.

Considerando de forma combinada ambos genes (*CYP2C19* y *ABCB1*), 187 pacientes (59%) no portaban genotipo de riesgo y 130 pacientes (41%) eran portadores de los genotipos de riesgo. La distribución de frecuencias genotípicas y de la variable principal de eficacia por subtipos fue: los pacientes sin genotipo de riesgo fueron el 59% (187 pacientes) tratados con clopidogrel y presentaron eventos el 9,1% (17 pacientes); el resto de pacientes con alguno de los genotipos de pérdida de función de clopidogrel y tratados con los nuevos antiagregantes fueron 68 pacientes con sólo LOF-*CYP2C19* (21,5%) que tuvieron el evento primario el 8,8% (6 pacientes), 44 pacientes sólo *ABCB1*-TT (13,9%) que mostraron una tasa de eventos cardiovasculares del 13,6% (6 pacientes), y, 18 pacientes con LOF-*CYP2c19* y *ABCB1*-TT (5,7%), tuvieron una tasa de eventos cardiovasculares del 16,7% (3 pacientes). Estas diferencias en los porcentajes de eventos no alcanzaba diferencia estadísticamente significativas por el método Kaplan-Meier (log rank 1,87; p = 0,61). Figura 17.

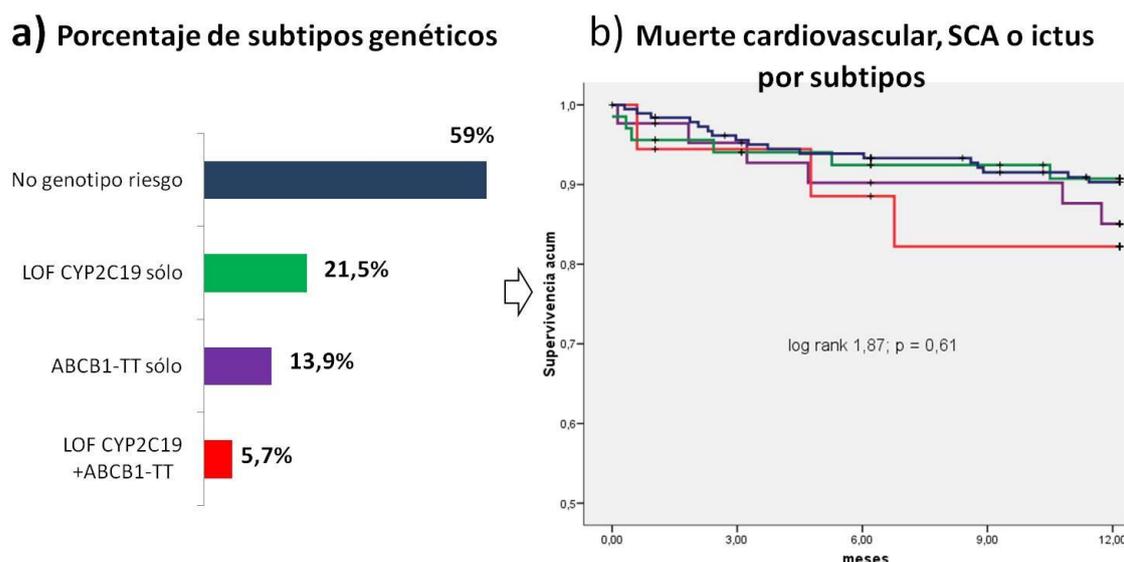


Figura 17. Distribución de frecuencias genotípicas y eventos por subtipos *CYP2C19* y *ABCB1* combinados

Ante estos hallazgos, evaluamos por separado el efecto de los polimorfismos *CYP2C19* y *ABCB1* en los pacientes tratados sólo con Prasugrel, que fue usado mayoritariamente como antiagregante inhibidor P2Y12 alternativo. Para ello, primero consideramos a los 84 pacientes con genotipo LOF-*CYP2C19* y tratados con Prasugrel y los comparamos con el resto del grupo intervención con genotipo *CYP2C19* 1/1 (228 pacientes); ambos grupos mostraban un porcentaje de evento primario similar (8,3% frente a 9,6%, $p=0,740$). Posteriormente, evaluamos a los 59 pacientes tratados con Prasugrel con el genotipo *ABCB1-TT* y los comparamos con el resto del grupo intervención con genotipo *ABCB1-CT* o *CC* (253 pacientes); los portadores *ABCB1-TT* mostraban una tendencia no significativa a presentar más evento primario que aquellos con genotipo *ABCB1-CC* o *CT* (13,6% frente a 8,3%, HR 1,72, IC 95% 0,8-3,8, $p=0,19$).

Por último, mostrar los resultados del análisis previo al desarrollo del estudio de intervención, para determinar la prevalencia del polimorfismo genético en *CYP2C19* y *ABCB1* en la población andaluza normal. Comprobamos las frecuencias genotípicas en una muestra de 100 controles del banco andaluz de DNA como referencia de población normal. La prevalencia de los polimorfismo fue: para el *CYP2C19**2: *1/*1=72.55% *1/*2=25.49% y *2/*2=1.96% (no-LOF = 72.55% Y LOF = 27,45%); para el *ABCB1*: CC=35.41%, CT=43.75%, TT=20.83% (sin riesgo= 79,16% y en riesgo= 20.83%). *CYP2C19**3: ninguno. Fig 18.

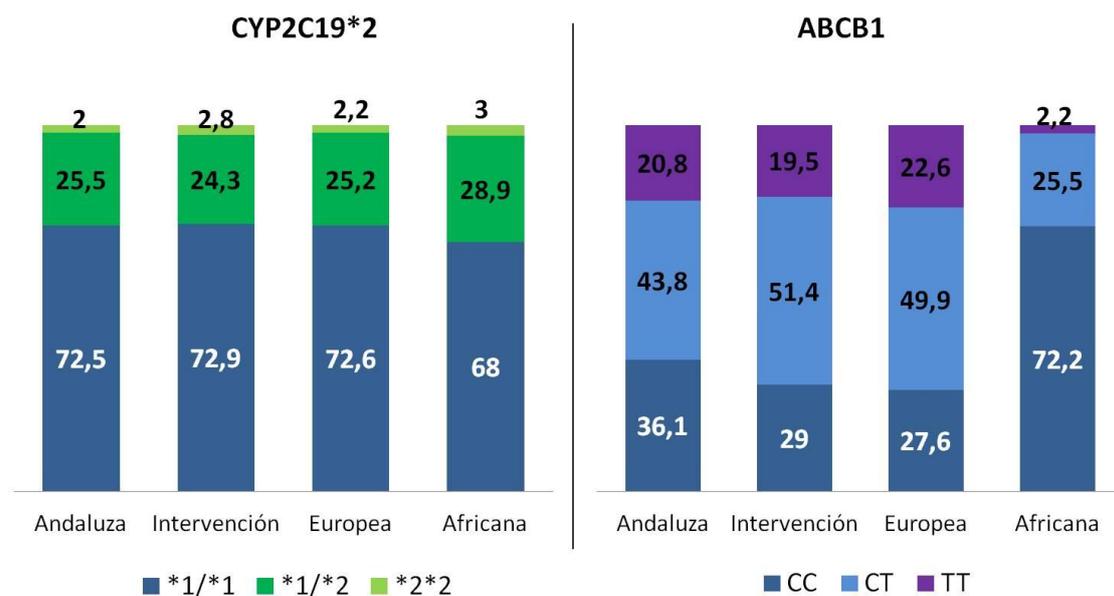


Figura 18. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos *CYP2C19* y *ABCB1* en diferentes poblaciones

Esta distribución genotípica de la muestra de población control “normal” es prácticamente igual a la población genotipada de nuestro estudio. Sus frecuencias,

como cabía esperar, son similares a las poblaciones cercanas, la población europea y africana, descritas en el proyecto 1000 genomas (48, 49). En el caso del polimorfismo *ABCB1* si vemos una mayor divergencia con la africana.

Considerados de forma conjunta el 59% de la muestra no portaban genotipo de déficit de función de clopidogrel y mientras que el otro 41% eran portadores del genotipo de riesgo, con una distribución similar al grupo intervención de nuestro estudio.



DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Principios, relaciones y generalizaciones que los resultados indican.

Hasta donde conocemos, éste es el primer estudio que ha investigado si la elección de la doble terapia antiagregante personalizada basada en un test genético, reduce las tasas de eventos cardiovasculares y hemorragias en pacientes sometidos a ICP.

Por otra parte, esta estrategia guiada por genotipado combina tres polimorfismos en los genes *CYP2C19* y *ABCB1*, apoyados por el subestudio genético TRITON-TIMI-38 publicado por Mega et al (3) que permitiría incluir la estrategia farmacogenética al seleccionar la terapia antiagregante en pacientes de alto riesgo sometidos a ICP: clopidogrel para el buen respondedor a este fármaco y prasugrel o ticagrelor para aquellos con mala respuesta o resistencia al clopidogrel.

Nuestros resultados indican que la estrategia de elección del tratamiento antiagregante guiado por genotipado en pacientes sometidos a ICP con stent, comparado con la estrategia previa sin genotipar, reduce la tasa de muerte cardiovascular, ACS o accidente cerebrovascular durante los primeros 12 meses tras la ICP y bajo tratamiento antiagregante doble. Se observó una reducción en los componentes individuales del objetivo primario, pero sólo alcanzó significación estadística la reducción en mortalidad por causas cardiovasculares.

Además, este beneficio se produjo sin aumento de los sangrados con

repercusión clínica y con un efecto neto, considerando de forma conjunta la variable principal de eficacia y seguridad, favorable a la estrategia de genotipado.

Igualmente hubo un menor porcentaje, aunque no significativo, de revascularizaciones urgentes no relacionadas con trombosis del stent en el grupo genotipado, y no hubo diferencias en los casos de trombosis de stent.

Por otra parte, en el grupo intervención con la terapia antiagregante guiada por el genotipo, no hubo diferencias en la tasa de eventos o sangrados según las diferentes terapias antiagregantes utilizadas. Por lo que clopidogrel en ausencia de genes de pobre respuesta, se comportaría tan eficaz como prasugrel o ticagrelor para evitar eventos.

Esta ausencia de diferencias entre los tratamientos antiagregantes en el grupo intervención, sugiere que el beneficio demostrado con la estrategia de genotipado sobre la estrategia no guiada del grupo control, no sería debido al mayor porcentaje de uso de los nuevos antiagregantes en el grupo intervención, sino probablemente por la prevención del fenómeno de resistencia al clopidogrel en el grupo control.

La prevalencia de los polimorfismos en *CYP2C19* y *ABCB1* en la población sana de nuestro entorno fue similar a los pacientes del grupo intervención, y a su vez muy similar a la descrita en proyecto 1000 genomas (48) para la población europea y algo divergente a la africana sólo para el polimorfismo en *ABCB1* (figura 15), pero que se explicaría por la situación intermedia de nuestra población de estudio y control sano, entre la población europea y africana. Estos datos

apoyarían la no asociación de estos polimorfismos como factor de riesgo patogénico directo de enfermedad cardiovascular aterotrombótica, sino sólo como un marcador o modulador de la respuesta a clopidogrel.

5.2 Consecuencias teóricas del trabajo y sus posibles

aplicaciones prácticas.

Estos resultados confirmarían las recomendaciones de las agencias de medicamentos de realizar el genotipado de los polimorfismos que afectan a la función de clopidogrel, antes de su uso en los pacientes de alto riesgo, para comprobar que el paciente es buen respondedor; y según nuestro estudio, probablemente no sólo el genotipado del *CYP2C19* sino que también debería incluir del *ABCB1*.

También demuestra como estrategia válida dentro de la medicina personalizada, el evitar los casos de pobre respuesta a clopidogrel eligiendo como alternativa los nuevos antiagregantes del receptor P2Y₁₂, prasugrel o ticagrelor, frente al aumento de dosis de clopidogrel, que no se ha demostrado eficaz en estudios previos con el tratamiento guiado personalizado (134, 137).

Por otro lado, la alta prevalencia en nuestra área de estos polimorfismos de fracaso de clopidogrel, hasta el 40% de la población, hace necesario implementar el estudio farmacogenético en aquellos pacientes de alto riesgo sometidos a intervención coronaria percutánea. Esto debería de realizarse por lo menos siempre que se plantee el tratamiento con clopidogrel, para asegurarnos de la

eficacia del tratamiento antiagregante prescrito, y probablemente también, para un uso selectivo de los nuevos antiagregantes que evitara el exceso de hemorragias y costes que supondría la adopción universal de estos últimos: pasar de la talla única antiagregante al tratamiento personalizado guiado por genotipado.

Este estudio farmacogenético cobra más importancia teniendo en cuenta el uso actual generalizado de la estrategia intervencionista percutánea en el paciente coronario. En el último registro de manejo del SCA en España en 2012 (146), que incluyó una población de pacientes con IAM en el 69,2% y AI en el 21,8%, se realizó coronariografía en el 84% de todos ellos, se practicó revascularización con ICP al 61% y se indicó cirugía coronaria sólo al 5% de los pacientes.

La combinación de AAS con un potente inhibidor del receptor P2Y12 (prasugrel o ticagrelor) se recomienda en la mayoría de estos pacientes con SCA y sobre todo si han sido sometidos a ICP. Sin embargo, en la toma de decisiones respecto a la elección del mejor tratamiento antiagregante para cada paciente, deben ser considerados tanto su riesgo isquémico como su riesgo de sangrado junto a factores individuales del mismo. En nuestra área sanitaria se ha consensuado con las diferentes unidades clínicas implicadas en la atención del paciente con SCA, un algoritmo para la elección del tratamiento antagonista P2Y12 basados en las guías clínicas de las sociedades científicas y que ha incluido como una opción alcanzable en base nuestro trabajo de investigación, la terapia personalizada basada en la genética. Anexo III: algoritmo para la elección del tratamiento antagonista P2Y12.

5.3 Excepciones o faltas de correlación y aspectos no resueltos.

El beneficio de la estrategia de genotipado se observó en una población de pacientes sometidos a ICP con stent y mayoritariamente con SCA tanto sin elevación del ST como con elevación, aunque en este último caso la estrategia de reperfusión predominante durante el estudio fue la trombolisis, por lo que nuevos estudios actualmente en marcha deberán confirmar el beneficio del uso del genotipado en el contexto de la ICP primaria (147).

Las pruebas genéticas en el punto de atención después de la ICP pueden realizarse eficazmente a la cabecera de la cama, aunque el retraso hasta el diagnóstico genético en nuestro estudio fue de 3 días de media, lo que expone al paciente a un riesgo de complicaciones trombóticas en el periodo más precoz y vulnerable tras la ICP. Dada la necesidad de decisiones de tratamiento emergentes y con la perspectiva de que la terapia personalizada pueda producir el mayor beneficio terapéutico en estos pacientes de tan alto riesgo, una estrategia a explorar, al menos en el contexto del SCA, sería iniciar con el tratamiento antiagregante más potentes en el momento de la ICP y una vez obtenido el resultado genético, desescalar el tratamiento hacia clopidogrel en los buenos respondedores. En nuestro estudio los cambios de clopidogrel a prasugrel/ticagrelor o viceversa, la administración de dosis de carga antes de comenzar con la dosis de mantenimiento fue opcional, aunque en la práctica no hubo ninguna. Hubo un caso de trombosis protésica en el cambio de clopidogrel a prasugrel en un paciente resistente a clopidogrel antes del inicio de este.

En cuanto a los resultados de los diferentes antiagregantes en el grupo de

intervención en el contexto farmacogenético, hay que tener en cuenta que el tamaño muestral fue calculado para el objetivo primario del estudio y probablemente no alcanzamos potencia estadística para demostrar diferencias en objetivos secundarios, y, serían necesarios más estudios para confirmar nuestros resultados.

En nuestro estudio, la personalización del tratamiento antiagregante con el uso selectivo mayoritariamente de prasugrel se basó en el estado de portador de *CYP2C19*2* y/o *ABCB1-TT*. Aunque el alelo *CYP2C19*2* es un potente y más estudiado predictor de fracasos de tratamiento con clopidogrel después de la ICP, la incorporación de otro alelo, el *ABCB1-TT*, mejora la capacidad de identificar individuos en riesgo. Sin embargo, la influencia de este polimorfismo en la absorción de otros fármacos como Prasugrel no está totalmente aclarada. En nuestro estudio, al igual que en el subestudio genético de TRITON-TIMI 38 (60), los pacientes en tratamiento con Prasugrel con el genotipo *ABCB1-TT* mostraban una tendencia a tener más eventos. Probablemente en este caso, en portadores del genotipo *ABCB1-TT*, la mejor alternativa a clopidogrel sería ticagrelor que no parece influirse claramente por este polimorfismo (63)

En nuestra estrategia antiagregante guiada no tuvimos en cuenta la variante alélica del *CYP2C19*17* que confiere una ganancia de función y una propensión aumentada hacia el sangrado al recibir clopidogrel. Las pautas farmacogenéticas actuales recomiendan la dosificación estándar de 75 mg diarios a los portadores de este genotipo (148) dando más trascendencia a los alelos que conllevan pérdida de función, con posibilidad de tratamientos alternativos y asumiendo que en

pacientes portadores *CYP2C19*2/*17* la pérdida de función no se compensa con la ganancia.

Sin embargo, en el estudio RAPID STEMI (137), que analizó esta variante junto alelos LOF *CYP2C19* y/o el genotipo *ABCB1-TT*, no hubo homocigotos portadores de *CYP2C19*17* que tuvieran alta reactividad plaquetaria al mes de la ICP estando en tratamiento con clopidogrel, lo que sugeriría que esta variante anularía el efecto negativo de los genotipo de riesgo y probablemente no necesitarían cambio a antiagregantes más potentes. La prevalencia de este grupo en el estudio fue del 6,1% aunque con un tamaño muestral muy pequeño (3 pacientes fueron portadores *17/*17 de 30 pacientes con alelo *CYP2C19*2* o genotipo *ABCB1 TT*). Se requerirían estudios prospectivos más amplios para investigar más a fondo, el impacto de este polimorfismo entre los individuos que también llevan alelos LOF *CYP2C19* y/o el genotipo *ABCB1 TT*.

Hay otros factores, aparte de la genética, que pueden afectar la respuesta de clopidogrel. La prevalencia de eventos cardiovasculares entre los no portadores tratados con dosis estándar de clopidogrel en nuestro estudio fue todavía del 10% y algunos pacientes persisten con reactividad plaquetaria alta bajo tratamiento con clopidogrel a pesar de no ser portadores de estos genes de riesgo (entre el 4,8 y 9,5% en el RAPID STEMI) (137). Nuestro estudio fue diseñado para evaluar una estrategia de elección de tratamiento que utilizaba como guía sólo la genética, aunque en el análisis multivariante se incluyeron otras variables que previamente se sabe que influyen en la reactividad plaquetaria mediada por clopidogrel (como la diabetes, IMC y el uso de IBP) y que pudieran tener una diferente distribución

entre los dos grupos de tratamiento. Sin embargo, de ellos sólo el estatus de portador para un genotipo de riesgo fue predictor independiente de eventos. La edad y el número de stent utilizados, probablemente como reflejo de la extensión de la enfermedad coronaria, fueron también predictores independientes de eventos. El poder discriminante de nuestro modelo predictivo multivariante para discernir entre los pacientes que van a presentar el evento primario del estudio, frente a aquellos que no lo presentarán medido por el índice de concordancia, fue del 0.64, lo que indica una buena capacidad de discriminación. Sin embargo, las estrategias futuras de elección de tratamiento antiagregante quizás requieran la consideración de un enfoque multifactorial que aborde causas genéticas y no genéticas en la prevención de eventos cardiovasculares (149). Figura 19. Los factores modificables y no modificables (incluyendo la genética) se ilustran en la figura. El tratamiento antiagregante anti-P2Y12 guiado por el genotipo *CYP2C19* y *ABCB1* mejoran los resultados en eventos isquémicos y hemorrágicos después del tratamiento invasivo con ICP.

La influencia de acontecimientos externos a lo largo del tiempo puede justificar la diferente distribución de las características basales terapéuticas entre los grupos. La alerta farmacológica de la EMA y la FDA (46, 47) sobre una posible interacción entre clopidogrel y los IBP que finalmente se focalizó en el omeprazol, podría justificar el menor uso de IBP en el grupo control. El mayor uso de angioplastia primaria y de stent recubiertos en el grupo intervención igualmente sería reflejo de la mejora de la atención sanitaria al SCA (14). No obstante, estas variables no fueron predictoras de eventos en el análisis multivariante en nuestro

estudio.

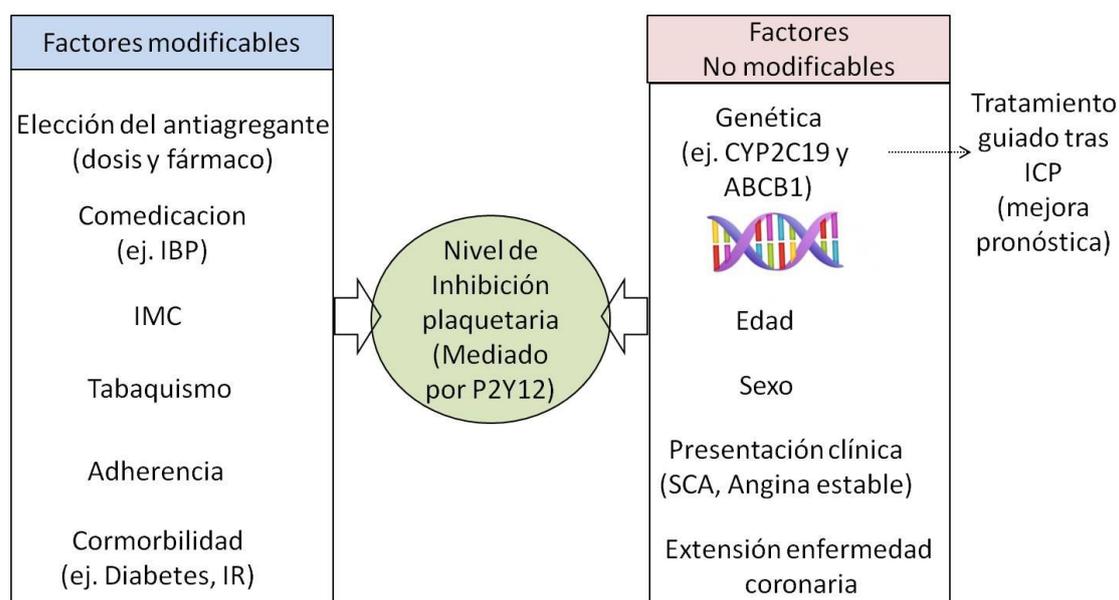


Figura 19. Factores que influyen en el nivel de agregación plaquetaria.

5.4 Nuestros resultados e interpretaciones con los trabajos de investigación previos de otros autores.

Comparando nuestros resultados con los publicados anteriormente, podemos observar que la tasa de eventos cardiovasculares en nuestro estudio (10%) es ligeramente superior a la publicada por Mega et al (60) para los pacientes no resistentes a clopidogrel (6,3%). Esta diferencia podría explicarse porque el 41,5% de los pacientes con SCA incluidos en nuestro estudio eran IAMCEST, mientras que en el ensayo clínico pivotal del TRITON TIMI 38 (20) sólo el 26% de los pacientes fueron pacientes con IAMCEST. Del mismo modo, en nuestro estudio la media de edad y el porcentaje de diabéticos fueron mayores que

los incluidos en el ensayo clínico pivotal (11). Por último, el evento combinado principal de nuestro estudio incluyó el SCA tanto por IAM como por AI, mientras que en el subestudio de Mega et al sólo incluyó el IAM. En nuestro estudio, se incluyó la AI en el evento combinado principal para prevenir el impacto que supuso la introducción de las troponinas ultrasensibles durante el desarrollo del estudio en el diagnóstico del IAM.

Sin embargo, en el subestudio genético del estudio PLATO (63), cuyo evento combinado principal también incluyó sólo el IAM, sus resultados mostraron que los pacientes no resistentes al clopidogrel tenían una tasa de eventos cardiovasculares similar a nuestros resultados (9,5%).

En cuanto a la tasa de hemorragias menores y mayores no relacionadas con la cirugía coronaria para clopidogrel referidas en el estudio TRITON TIMI 38 (20) fueron similares a las descritas en nuestro estudio (3,8%); sin embargo el exceso de hemorragias en el grupo Prasugrel (5%) se redujo en nuestro estudio con el uso selectivo de los nuevos antiagregantes (4,1%). Para Ticagrelor no disponemos de datos comparables pues la tasa de hemorragias menores y mayores referida en el estudio PLATO incluyó a las hemorragias relacionadas con CABG.

Con respecto a los dos estudios previamente comentados que han usado el genotipado para guiar el tratamiento doble antiagregante, el RAPID GENE en 2012 (136) usando el alelo *CYP2C19*2* y el RAPID STEMI en 2016 (137) ampliando como marcadores de resistencia a clopidogrel los alelos *CYP2C19*2* y *ABCB1 TT*, demostraron que la estrategia farmacogenética guiada con el uso selectivo de Prasugrel frente a Clopidogrel en el tratamiento antiagregante después de una ICP

era eficaz para reducir la alta reactividad plaquetaria durante el tratamiento antiagregante doble. Sin embargo, el tiempo de análisis fue a muy corto plazo (en los primeros 7 días o primer mes de tratamiento) y a diferencia de estos, nuestro estudio es el primero que analiza el uso de la farmacogenética en resultados clínicos y no en objetivos subrogados como la agregación plaquetaria.

También demostraron que la identificación de estas variantes genéticas es factible a pie de cama incluso en pacientes con IAMCEST que reciben ICP precoz, aunque para ello utilizaron un dispositivo en el punto de atención (el dispositivo Spartan RX), que en 55 minutos permitía conocer el estado de portador de todos los alelos. Mientras que en nuestro estudio la identificación del estado de portador se realizó con la prueba genética estándar o convencional, con secuenciación directa de ADN en un laboratorio central que usaba el dispositivo Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System y la tecnología de genotipado descrita en el anexo III, con el retraso ya comentado en la obtención del diagnóstico genético.

Igualmente demostraron que los portadores *CYP2C19*2* y *ABCB1 TT* tenían una prevalencia significativamente mayor de hipereactividad plaquetaria al inicio tras clopidogrel comparado con los no portadores, apoyando su clasificación como un grupo de riesgo para el fracaso del tratamiento con clopidogrel.

Por otra parte, el tratamiento de los no portadores con clopidogrel resultó en que sólo el 4,6% de los sujetos tenían HPR a 1 mes sugiriendo que clopidogrel puede ser adecuado entre la gran mayoría de los sujetos que no poseen un genotipo de riesgo. Estos hallazgos apoyan nuestros resultados de una estrategia

personalizada pautando una terapia más potente a los pacientes “resistentes” o en riesgo de fracaso del tratamiento con clopidogrel, evitando al resto de los pacientes “sensibles” a clopidogrel el exceso de sangrados con los nuevos antiagregantes.

En los Países Bajos, se ha iniciado un ensayo multicéntrico, el estudio genético “POPULAR” (NCT01761786) en el que 2.700 pacientes con IAMCEST sometidos a angioplastia primaria son randomizados en el grupo intervención a tratamiento antiagregante guiado por genotipado o en el grupo control al tratamiento estándar actualmente recomendado de Ticagrelor o Prasugrel. El brazo genotipado se ha focalizado en los polimorfismos en *CYP2C19*, y aquellos pacientes portadores de un alelo LOF se prescribirá prasugrel o Ticagrelor, y en los pacientes no portadores de estos alelos LOF, se prescribirá clopidogrel (147).

De manera similar, en el estudio “The Tailored Antiplatelet Therapy Following PCI” (TAILOR-PCI), se reclutarán 5.000 pacientes con SCA o enfermedad coronaria estable todos sometidos a ICP con stent. Se asignarán al azar a un brazo de terapia convencional con clopidogrel o un enfoque prospectivo de terapia antiplaquetaria guiada basada en el genotipo *CYP2C19* con Ticagrelor para los portadores LOF y clopidogrel para los no portadores (NCT01742117).

Otros estudios en marcha que también están evaluando una estrategia selectiva de uso de Prasugrel o Ticagrelor en pacientes con genotipos de riesgo tras un IAM y/o ICP son “Bedside Testing of CYP2C19 Gene for Treatment of Patients With PCI With Antiplatelet Therapy” (NCT01823185) en pacientes con IAM y elegibles para ICP en las primeras 12 horas, con antiagregante selectivo guiado por polimorfismos en *CYP2C19*, y el PRAISE-GENE, “PRAsugrel or

clopidogrel in Acute Coronary Syndrome Patients With CYP2C19 Polymorphism” (NCT01641510), en pacientes con SCA sometidos a ICP guiados por *CYP2C19*.

El estudio PREPARE (150), financiado por la Comisión Europea en el programa H2020, en el que nuestro grupo de investigación está participando dentro de un ambicioso programa de implementación de la farmacogenómica en Europa, es un ensayo cruzado abierto aleatorizado en 7 países europeos, que va a investigar un enfoque de genotipado preventivo con un panel de 56 variantes farmacogenéticas que abarca 13 importantes asociaciones fármacos-genes como un nuevo modelo de medicina personalizada. De los 8000 pacientes que se incluirán, un 10% de ellos (800 pacientes) recibirán en el grupo control tratamiento con clopidogrel sin genotipado o en el grupo intervención tratamiento guiado en base al polimorfismo *CYP2C19*, en el contexto predominante de la cardiopatía isquémica, aunque también en otras patologías como la arteriopatía periférica o el ictus.

El Consorcio de implementación farmacogenética (CPIC) ha publicado unas guías en 2013 que recomienda el uso de la información genética para guiar el tratamiento con clopidogrel, además advirtiendo de que la evidencia es convincente para la relación entre el genotipo *CYP2C19* y la respuesta al clopidogrel en pacientes con SCA sometidos a ICP(151). Sin embargo, no da recomendaciones sobre el *ABCB1* porque hasta ahora la evidencia se sigue considerando insuficiente.

5.5 Limitaciones del estudio

Existen varias limitaciones en este estudio.

En primer lugar, se trata de un diseño experimental en el que el grupo control es un grupo retrospectivo. Por un lado, no nos pareció ético mantener un grupo control tratado con clopidogrel sin tener en cuenta su genotipo, dada la evidencia disponible sobre la resistencia genética a clopidogrel, y, las recomendaciones de las guías europeas y americanas (12, 13, 108, 109) de usar clopidogrel como fármaco de segunda línea en el SCA priorizando prasugrel o ticagrelor. Por otro lado, esta estrategia nos permitiría reducir el período de reclutamiento haciendo la muestra más homogénea.

Para evitar el sesgo de selección en el grupo de control, los pacientes fueron seleccionados sobre la base de los criterios de inclusión después de la ICP con stent, sin ser conocedores de la evolución en el período posterior. Asimismo, para evitar los sesgos de confusión, en la fase de análisis los resultados del estudio se ajustaron en un modelo multivariado.

Por último, sólo individuos de raza caucásica se incluyeron en este estudio y la traslación de nuestros resultados a otras poblaciones necesitaría de confirmación con futuras investigaciones.



CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

a) Nuestros resultados sugieren que en pacientes con enfermedad coronaria sometidos a ICP con stent, la elección del tratamiento antiagregante con una estrategia guiada por genotipado de los polimorfismos en los genes *CYP2C19* y *ABCB1*, frente a la estrategia sin genotipado, durante los primeros 12 meses tras la ICP y bajo el tratamiento antiagregante doble:

- Reduce las tasas del combinado de muerte cardiovascular, SCA o accidente cerebrovascular. Esta reducción se produjo principalmente por una reducción en la mortalidad cardiovascular.
- No incrementa la tasa de hemorragias TIMI mayores y/o menores no relacionadas con CABG con el uso selectivo de los antiagregantes más potentes.
- Tiene un efecto neto favorable en la prevención conjunta tanto de eventos trombóticos como de las hemorragias.
- Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los casos de trombosis de stent ni en el porcentaje de revascularizaciones urgentes no relacionadas con trombosis del stent, aunque este último fue numéricamente inferior en el grupo genotipado.

b) Dentro del grupo de pacientes con tratamiento antiagregante guiado por el genotipo de los polimorfismos en *CYP2C19* y *ABCB1*:

- El 59% de los pacientes fueron “no portadores” de genotipos de riesgo (sensibles a clopidogrel) y el 41% fueron “portadores” de los genotipos de riesgo

(resistentes a clopidogrel): el 21,5% sólo LOF-*CYP2C19*, el 13,6% sólo *ABCB1-TT* y el 5,7% ambos.

- El tratamiento antiagregante doble en condiciones de genotipado, no mostró diferencias en el combinado de mortalidad cardiovascular, SCA o ictus entre los pacientes tratados con clopidogrel en comparación con los nuevos antiagregantes, ni tampoco en la tasa de hemorragias TIMI menores y/o mayores.

c) Por último, la prevalencia de los polimorfismos genéticos en una población sana control en nuestro medio es similar a la descrita para la población caucásica europea y algo diferente a la norteafricana respecto al genotipo *ABCB1*.

Principales avances que supone este trabajo de investigación:

1) Es el primer estudio que investiga los "resultados clínicos" de la elección de la terapia antiplaquetaria basada en un test genético.

2) Apoya la recomendación de las guías de farmacogenética de realizar el genotipado en pacientes con cardiopatía isquémica tratados con stent, siempre que se considere usar clopidogrel como tratamiento antiagregante doble que acompañe al AAS.

3) Supone una contribución original en la "medicina personalizada" que se centra en una estrategia farmacogenética: clopidogrel para el buen respondedor a este fármaco, y, prasugrel o ticagrelor para aquellos con respuesta inadecuada a clopidogrel.

El tratamiento antiagregante personalizado basada en la genética es un objetivo actualmente alcanzable, aunque investigación adicional en marcha deberá confirmar nuestros resultados.



BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFIA

1. Wiviott SD, Steg PG. Clinical evidence for oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes. *Lancet*. 2015 Jul 18; 386(9990): 292-302.
2. Defunciones según la Causa de Muerte. Año 2014. Instituto Nacional de Estadística; feb 2016; Available from: <http://www.ine.es/prensa/np896.pdf>.
3. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005 Jun 28; 111(25): 3481-8.
4. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Apr 18; 47(8 Suppl): C13-8.
5. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012 Oct; 33(20): 2551-67.
6. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10; 361(11): 1045-57.
7. Mehta SR, Cannon CP, Fox KA, Wallentin L, Boden WE, Spacek R, et al. Routine vs selective invasive strategies in patients with acute coronary syndromes: a collaborative meta-analysis of randomized trials. *JAMA*. 2005 Jun 15; 293(23): 2908-17.
8. Bavry AA, Kumbhani DJ, Rassi AN, Bhatt DL, Askari AT. Benefit of early invasive therapy in acute coronary syndromes: a meta-analysis of contemporary randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Oct 3; 48(7): 1319-25.
9. O'Donoghue M, Boden WE, Braunwald E, Cannon CP, Clayton TC, de Winter

RJ, et al. Early invasive vs conservative treatment strategies in women and men with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis. *JAMA*. 2008 Jul 2; 300(1): 71-80.

10. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2013 Oct; 34(38): 2949-3003.

11. Brar SS, Leon MB, Stone GW, Mehran R, Moses JW, Brar SK, et al. Use of drug-eluting stents in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2009 May 5; 53(18): 1677-89.

12. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blomstrom-Lundqvist C, Borger MA, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2012 Oct; 33(20): 2569-619.

13. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016 Jan 14; 37(3): 267-315.

14. Flores-Mateo G, Grau M, O'Flaherty M, Ramos R, Elosua R, Violan-Fors C, et al. [Analyzing the coronary heart disease mortality decline in a Mediterranean population: Spain 1988-2005]. *Rev Esp Cardiol*. 2011 Nov; 64(11): 988-96.

15. Tang EW, Wong CK, Herbison P. Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) hospital discharge risk score accurately predicts long-term mortality post

acute coronary syndrome. *Am Heart J.* 2007 Jan; 153(1): 29-35.

16. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007 Dec 13; 357(24): 2482-94.

17. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circ J.* 2010 Apr; 74(4): 597-607.

18. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ.* 2002 Jan 12; 324(7329): 71-86.

19. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet.* 1996 Nov 16; 348(9038): 1329-39.

20. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007 Nov 15; 357(20): 2001-15.

21. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001 Aug 16; 345(7): 494-502.

22. White HD. Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: current evidence and new directions. *Am Heart J.* 2011 Mar; 161(3): 450-61.

23. Billett HH. Antiplatelet agents and arterial thrombosis. *Cardiol Clin.* 2008 May; 26(2): 189-201.

24. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ.*

1994 Jan 8; 308(6921): 81-106.

25. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet*. 2006 Feb 18; 367(9510): 606-17.

26. Derry S, Loke YK. Risk of gastrointestinal haemorrhage with long term use of aspirin: meta-analysis. *BMJ*. 2000 Nov 11; 321(7270): 1183-7.

27. He J, Whelton PK, Vu B, Klag MJ. Aspirin and risk of hemorrhagic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 1998 Dec 9; 280(22): 1930-5.

28. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, et al. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998 Dec 3; 339(23): 1665-71.

29. Bertrand ME, Legrand V, Boland J, Fleck E, Bonnier J, Emmanuelson H, et al. Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus antiplatelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. The full anticoagulation versus aspirin and ticlopidine (fantastic) study. *Circulation*. 1998 Oct 20; 98(16): 1597-603.

30. Bennett CL, Davidson CJ, Raisch DW, Weinberg PD, Bennett RH, Feldman MD. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine in the setting of coronary artery stents and stroke prevention. *Arch Intern Med*. 1999 Nov 22; 159(21): 2524-8.

31. Bhatt DL, Bertrand ME, Berger PB, L'Allier PL, Moussa I, Moses JW, et al. Meta-analysis of randomized and registry comparisons of ticlopidine with clopidogrel after stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jan 2; 39(1): 9-14.

32. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, et al.

Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet*. 2001 Aug 18; 358(9281): 527-33.

33. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Nov 20; 288(19): 2411-20.

34. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005 Nov 5; 366(9497): 1607-21.

35. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, Lopez-Sendon JL, Montalescot G, Theroux P, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2005 Mar 24; 352(12): 1179-89.

36. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med*. 2006 Apr 20; 354(16): 1706-17.

37. Mehta SR, Bassand JP, Chrolavicius S, Diaz R, Eikelboom JW, Fox KA, et al. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2010 Sep 2; 363(10): 930-42.

38. 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 Mar 16; 305(11): 1097-105.

39. Ficha técnica de clopidogrel. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/71773/71773_ft.pdf.

40. 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 Jun 17; 107(23): 2908-13.

41. Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Giusti B, Abbate R, Gensini GF. Clopidogrel non-responsiveness and risk of cardiovascular morbidity. An updated meta-analysis. *Thromb Haemost*. 2010 Apr; 103(4):841-8.

42. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Apr 10; 49(14): 1505-16.

43. 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 Aug 26; 302(8): 849-57.

44. Saw J, Brennan DM, Steinhubl SR, Bhatt DL, Mak KH, Fox K, et al. Lack of evidence of a clopidogrel-statin interaction in the CHARISMA trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jul 24; 50(4): 291-5.

45. Bhatt DL, Cryer BL, Contant CF, Cohen M, Lanos A, Schnitzer TJ, et al. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2010 Nov 11; 363(20): 1909-17.

46. Luria X. Interaction between clopidogrel and proton-pump inhibitors. Public statement European Medicine Agency march 2010; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/20

10/03/WC500076346.pdf.

47. FDA. FDA reminder to avoid concomitant use of Plavix (clopidogrel) and omeprazole. 2010; Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm231161.htm>.

48. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Oct 01; 526(7571): 68-74.

49. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012 Nov 01; 491(7422): 56-65.

50. Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature*. 2000 Jun 15; 405(6788): 857-65.

51. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2009 Jan 22; 360(4): 363-75.

52. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Nov; 80(5): 486-501.

53. Marin F, Gonzalez-Conejero R, Capranzano P, Bass TA, Roldan V, Angiolillo DJ. Pharmacogenetics in cardiovascular antithrombotic therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Sep 15; 54(12): 1041-57.

54. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. 2009 Jan 22; 360(4): 354-62.

55. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*. 2010 Feb 2; 121(4): 512-8.

56. Harmsze AM, van Werkum JW, Hackeng CM, Ruven HJ, Kelder JC, Bouman HJ, et al. The influence of CYP2C19*2 and *17 on on-treatment platelet reactivity and bleeding events in patients undergoing elective coronary stenting. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Mar; 22(3): 169-75.

57. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41(12): 913-58.

58. Santos PC, Soares RA, Santos DB, Nascimento RM, Coelho GL, Nicolau JC, et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med Genet*. 2011 Jan 19; 12: 13.

59. Collet JP, Hulot JS, Pena A, Villard E, Esteve JB, Silvain J, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet*. 2009 Jan 24; 373(9660): 309-17.

60. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet*. 2010 Oct 16; 376(9749): 1312-9.

61. Sorich MJ, Vitry A, Ward MB, Horowitz JD, McKinnon RA. Prasugrel vs. clopidogrel for cytochrome P450 2C19-genotyped subgroups: integration of the

TRITON-TIMI 38 trial data. *J Thromb Haemost*. 2010 Aug; 8(8): 1678-84.

62. Delaney JT, Ramirez AH, Bowton E, Pulley JM, Basford MA, Schildcrout JS, et al. Predicting clopidogrel response using DNA samples linked to an electronic health record. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Feb; 91(2): 257-63.

63. 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 Oct 16; 376(9749): 1320-8.

64. Bhatt DL, Pare G, Eikelboom JW, Simonsen KL, Emison ES, Fox KA, et al. The relationship between CYP2C19 polymorphisms and ischaemic and bleeding outcomes in stable outpatients: the CHARISMA genetics study. *Eur Heart J*. 2012 Sep; 33(17): 2143-50.

65. Pare 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 Oct 28; 363(18): 1704-14.

66. Doll JA, Neely ML, Roe MT, Armstrong PW, White HD, Prabhakaran D, et al. Impact of CYP2C19 Metabolizer Status on Patients With ACS Treated With Prasugrel Versus Clopidogrel. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Mar 1; 67(8): 936-47.

67. Sofi F, Giusti B, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF. Cytochrome P450 2C19*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. 2011 Jun; 11(3): 199-206.

68. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda LE, Pahl A, Valina CM, et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous

coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008 May 20; 51(20): 1925-34.

69. Sibbing D, Stegherr J, Latz W, Koch W, Mehilli J, Dorrlers K, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2009 Apr; 30(8): 916-22.

70. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccchia R, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Dec; 17(12): 1057-64.

71. Bauer T, Bouman HJ, van Werkum JW, Ford NF, ten Berg JM, Taubert D. Impact of CYP2C19 variant genotypes on clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2011; 343: d4588.

72. Malek LA, Kisiel B, Spiewak M, Grabowski M, Filipiak KJ, Kostrzewa G, et al. Coexisting polymorphisms of P2Y12 and CYP2C19 genes as a risk factor for persistent platelet activation with clopidogrel. *Circ J*. 2008 Jul; 72(7): 1165-9.

73. Tiroch KA, Sibbing D, Koch W, Roosen-Runge T, Mehilli J, Schomig A, et al. Protective effect of the CYP2C19 *17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am Heart J*. 2010 Sep; 160(3): 506-12.

74. Harmsze AM, van Werkum JW, Ten Berg JM, Zwart B, Bouman HJ, Breet NJ, et al. CYP2C19*2 and CYP2C9*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study. *Eur Heart J*. 2010 Dec; 31(24): 3046-53.

75. Sawada T, Shinke T, Shite J, Honjo T, Haraguchi Y, Nishio R, et al. Impact of cytochrome P450 2C19*2 polymorphism on intra-stent thrombus after drug-

eluting stent implantation in Japanese patients receiving clopidogrel. *Circ J*. 2011; 75(1): 99-105.

76. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med*. 2011 Jan; 17(1): 110-6.

77. Jang JS, Cho KI, Jin HY, Seo JS, Yang TH, Kim DK, et al. Meta-analysis of cytochrome P450 2C19 polymorphism and risk of adverse clinical outcomes among coronary artery disease patients of different ethnic groups treated with clopidogrel. *Am J Cardiol*. 2012 Aug 15; 110(4): 502-8.

78. Tang XF, He C, Yuan JQ, Meng XM, Yang YJ, Qin XW, et al. [Impact of cytochrome P450 2C19 polymorphisms on outcome of cardiovascular events in clopidogrel-treated Chinese patients after percutaneous coronary intervention]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2011 Jul; 39(7): 617-20.

79. Oh IY, Park KW, Kang SH, Park JJ, Na SH, Kang HJ, et al. Association of cytochrome P450 2C19*2 polymorphism with clopidogrel response variability and cardiovascular events in Koreans treated with drug-eluting stents. *Heart*. 2012 Jan; 98(2): 139-44.

80. 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 Oct 27; 304(16): 1821-30.

81. Holmes MV, Perel P, Shah T, Hingorani AD, Casas JP. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011 Dec 28; 306(24): 2704-14.

82. Campo G, Parrinello G, Ferraresi P, Lunghi B, Tebaldi M, Miccoli M, et al. Prospective evaluation of on-clopidogrel platelet reactivity over time in patients treated with percutaneous coronary intervention relationship with gene polymorphisms and clinical outcome. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jun 21; 57(25): 2474-83.

83. Jeong YH, Tantry US, Kim IS, Koh JS, Kwon TJ, Park Y, et al. Effect of CYP2C19*2 and *3 loss-of-function alleles on platelet reactivity and adverse clinical events in East Asian acute myocardial infarction survivors treated with clopidogrel and aspirin. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011 Dec 1; 4(6): 585-94.

84. Komarov AL, Panchenko EP, Donnikov AE, Shakhmatova OO, Dzhaliilova GV, Iliushchenko TA. [Factors determining clinical effectiveness of clopidogrel and prognosis of patients with stable ischemic heart disease]. *Kardiologiya*. 2011; 51(2): 8-18.

85. Ono T, Kaikita K, Hokimoto S, Iwashita S, Yamamoto K, Miyazaki Y, et al. Determination of cut-off levels for on-clopidogrel platelet aggregation based on functional CYP2C19 gene variants in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Thromb Res*. 2011 Dec; 128(6): e130-6.

86. Hulot JS, Collet JP, Silvain J, Pena A, Bellemain-Appaix A, Barthelemy O, et al. Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C19*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jul 6; 56(2): 134-43.

87. Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomas M, et al. Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary

artery disease treated with clopidogrel. *Heart*. 2012 Jan; 98(2): 100-8.

88. Su J, Xu J, Li X, Zhang H, Hu J, Fang R, et al. ABCB1 C3435T polymorphism and response to clopidogrel treatment in coronary artery disease (CAD) patients: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46366.

89. Spiewak M, Malek 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 Aug; 67(8): 827-34.

90. Jaitner J, Morath T, Byrne RA, Braun S, Gebhard D, Bernlochner I, et al. No association of ABCB1 C3435T genotype with clopidogrel response or risk of stent thrombosis in patients undergoing coronary stenting. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012 Feb 1; 5(1): 82-8, S1-2.

91. 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 Jan; 23(1): 48-53.

92. Mao L, Jian C, Changzhi L, Dan H, Suihua H, Wenyi T, et al. Cytochrome CYP2C19 polymorphism and risk of adverse clinical events in clopidogrel-treated patients: a meta-analysis based on 23,035 subjects. *Arch Cardiovasc Dis*. 2013 Oct; 106(10): 517-27.

93. Niu X, Mao L, Huang Y, Baral S, Li JY, Gao Y, et al. CYP2C19 polymorphism and clinical outcomes among patients of different races treated with clopidogrel: A systematic review and meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2015 Apr; 35(2): 147-56.

94. Hou X, Shi J, Sun H. Gene polymorphism of cytochrome P450 2C19*2 and clopidogrel resistance reflected by platelet function assays: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014 Sep; 70(9): 1041-7.

95. Connolly SJ, Pogue J, Hart RG, Hohnloser SH, Pfeffer M, Chrolavicius S, et al. Effect of clopidogrel added to aspirin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2009 May 14; 360(20): 2066-78.

96. Johnson JA, Cavallari LH. Pharmacogenetics and cardiovascular disease--implications for personalized medicine. *Pharmacol Rev.* 2013 Jul; 65(3): 987-1009.

97. Holmes DR, Jr., 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 endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Jul 20; 56(4): 321-41.

98. Niitsu Y, Jakubowski JA, Sugidachi A, Asai F. Pharmacology of CS-747 (prasugrel, LY640315), a novel, potent antiplatelet agent with in vivo P2Y12 receptor antagonist activity. *Semin Thromb Hemost.* 2005 Apr; 31(2): 184-94.

99. Wallentin L, Varenhorst C, James S, Erlinge D, Braun OO, Jakubowski JA, et al. Prasugrel achieves greater and faster P2Y12receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2008 Jan; 29(1): 21-30.

100. Jernberg T, Payne CD, Winters KJ, Darstein C, Brandt JT, Jakubowski JA, et al. Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of

non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2006 May; 27(10): 1166-73.

101. 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 Jan; 153(1): 66 e9-16.

102. Wiviott SD, Trenk D, 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 Dec 18; 116(25): 2923-32.

103. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation*. 2009 May 19; 119(19): 2553-60.

104. evaluacion OC. Informe de evaluación de Ticagrelor. Junio 2012; Availablefrom:www.osakidetza.euskadi.eus/r85.../es/.../eu.../ticagrelor_informe.pdf.

105. Mega JL, Simon T. Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments. *Lancet*. 2015 Jul 18; 386(9990): 281-91.

106. Wiviott SD, Braunwald E, Angiolillo DJ, Meisel S, Dalby AJ, Verheugt FW, et al. Greater clinical benefit of more intensive oral antiplatelet therapy with

prasugrel in patients with diabetes mellitus in the trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel-Thrombolysis in Myocardial Infarction 38. *Circulation*. 2008 Oct 14; 118(16): 1626-36.

107. Eikelboom JW, Mehta SR, Anand SS, Xie C, Fox KA, Yusuf S. Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2006 Aug 22; 114(8): 774-82.

108. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE, Jr., Ganiats TG, Holmes DR, Jr., et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Dec 23; 64(24): e139-228.

109. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, et al. 2015 ACC/AHA/SCAI Focused Update on Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention and the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Mar 15; 67(10): 1235-50.

110. Effient (prasugrel) tablets [prescribing information]. Indianapolis (Ind): Eli Lilly and Company; 2009.

111. Roe MT, Armstrong PW, Fox KA, White HD, Prabhakaran D, Goodman SG, et al. Prasugrel versus clopidogrel for acute coronary syndromes without revascularization. *N Engl J Med*. 2012 Oct 4; 367(14): 1297-309.

112. Montalescot G, Bolognese L, Dudek D, Goldstein P, Hamm C, Tanguay JF, et

al. Pretreatment with prasugrel in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2013 Sep 12; 369(11): 999-1010.

113. Anderson SD, Shah NK, Yim J, Epstein BJ. Efficacy and safety of ticagrelor: a reversible P2Y₁₂ receptor antagonist. *Ann Pharmacother*. 2010 Mar; 44(3): 524-37.

114. James S, Budaj A, Aylward P, Buck KK, Cannon CP, Cornel JH, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in acute coronary syndromes in relation to renal function: results from the Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) trial. *Circulation*. 2010 Sep 14; 122(11): 1056-67.

115. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Antonino MJ, Wei C, Teng R, et al. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation*. 2010 Mar 16; 121(10): 1188-99.

116. Verheugt FW, Clemmensen P, Mehran R, Agewall S, Pocock SJ, Goldstein S, et al. Antithrombotic outcome trials in acute coronary syndromes: seeking the optimal balance between safety and efficacy. *Eur Heart J*. 2013 Jun; 34(22): 1621-9.

117. Ducrocq G, Schulte PJ, Becker RC, Cannon CP, Harrington RA, Held C, et al. Association of spontaneous and procedure-related bleeds with short- and long-term mortality after acute coronary syndromes: an analysis from the PLATO trial. *EuroIntervention*. 2015 Nov; 11(7): 737-45.

118. Moscucci M, Fox KA, Cannon CP, Klein W, Lopez-Sendon J, Montalescot G, et al. Predictors of major bleeding in acute coronary syndromes: the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Eur Heart J*. 2003 Oct; 24(20): 1815-23.

119. Lopes RD, Subherwal S, Holmes DN, Thomas L, Wang TY, Rao SV, et al. The

association of in-hospital major bleeding with short-, intermediate-, and long-term mortality among older patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2012 Aug; 33(16): 2044-53.

120. Suh JW, Mehran R, Claessen BE, Xu K, Baber U, Dangas G, et al. Impact of in-hospital major bleeding on late clinical outcomes after primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction the HORIZONS-AMI (Harmonizing Outcomes With Revascularization and Stents in Acute Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Oct 18; 58(17): 1750-6.

121. Chan MY, Sun JL, Wang TY, Lopes RD, Jolicoeur ME, Pieper KS, et al. Patterns of discharge antiplatelet therapy and late outcomes among 8,582 patients with bleeding during acute coronary syndrome: a pooled analysis from PURSUIT, PARAGON-A, PARAGON-B, and SYNERGY. *Am Heart J*. 2010 Dec; 160(6): 1056-64, 64 e2.

122. Rao SV, Jollis JG, Harrington RA, Granger CB, Newby LK, Armstrong PW, et al. Relationship of blood transfusion and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *JAMA*. 2004 Oct 6; 292(13): 1555-62.

123. V. Jiménez Espínola MLS, E. Martínez Sáez, B. Martínez Vázquez, A. Matas Hoces, M. Mingorance Ballesteros, M. Nieto Rodríguez, C. Suárez Alemán. . Ticagrelor: informe de evaluación de medicamentos. Centro Andaluz de Documentación e Información de Medicamentos (CADIME); 2013 [cited 2013]; Available from: http://www.cadime.es/docs/informes/CADIME_IEM2013_Ticagrelor.pdf.

124. Goudevenos J, Xanthopoulou I, Deftereos S, Alexopoulos D. One-year Non-

persistence With Contemporary Antiplatelet Therapy in Acute Coronary Syndrome Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016 Aug; 69(8): 790-3.

125. Laporte JR, Bosch M. [The crisis and medicines policy]. *Aten Primaria*. 2012 Jun; 44(6): 306-8.

126. Mehta SR, Tanguay JF, Eikelboom JW, Jolly SS, Joyner CD, Granger CB, et al. Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial. *Lancet*. 2010 Oct 9; 376(9748): 1233-43.

127. Stone GW, Witzenbichler B, Guagliumi G, Peruga JZ, Brodie BR, Dudek D, et al. Bivalirudin during primary PCI in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008 May 22; 358(21): 2218-30.

128. Combescure C, Fontana P, Mallouk N, Berdague P, Labruyere C, Barazer I, et al. Clinical implications of clopidogrel non-response in cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2010 May; 8(5): 923-33.

129. Brar SS, ten Berg J, Marcucci R, Price MJ, Valgimigli M, Kim HS, et al. Impact of platelet reactivity on clinical outcomes after percutaneous coronary intervention. A collaborative meta-analysis of individual participant data. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov 1; 58(19): 1945-54.

130. Mega JL, Hochholzer W, Frelinger AL, 3rd, Kluk MJ, Angiolillo DJ, Kereiakes DJ, et al. Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA*. 2011 Nov 23; 306(20): 2221-8.

131. Parodi G, Marcucci R, Valenti R, Gori AM, Migliorini A, Giusti B, et al. High residual platelet reactivity after clopidogrel loading and long-term cardiovascular events among patients with acute coronary syndromes undergoing PCI. *JAMA*. 2011 Sep 21; 306(11): 1215-23.

132. Collet JP, Cuisset T, Range G, Cayla G, Elhadad S, Pouillot C, et al. Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med*. 2012 Nov 29; 367(22): 2100-9.

133. Aradi D, Komocsi A, Price MJ, Cuisset T, Ari H, Hazarbasanov D, et al. Efficacy and safety of intensified antiplatelet therapy on the basis of platelet reactivity testing in patients after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 1; 167(5): 2140-8.

134. Trenk D, Stone GW, Gawaz M, Kastrati A, Angiolillo DJ, Muller U, et al. A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Jun 12; 59(24): 2159-64.

135. Aradi D, Tornyos A, Pinter T, Vorobcsuk A, Konyi A, Falukozy J, et al. Optimizing P2Y12 receptor inhibition in patients with acute coronary syndrome on the basis of platelet function testing: impact of prasugrel and high-dose clopidogrel. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Mar 25; 63(11): 1061-70.

136. Roberts JD, Wells GA, Le May MR, Labinaz M, Glover C, Froeschl M, et al. Point-of-care genetic testing for personalisation of antiplatelet treatment (RAPID

GENE): a prospective, randomised, proof-of-concept trial. *Lancet*. 2012 May 5; 379(9827): 1705-11.

137. So DY, Wells GA, McPherson R, Labinaz M, Le May MR, Glover C, et al. A prospective randomized evaluation of a pharmacogenomic approach to antiplatelet therapy among patients with ST-elevation myocardial infarction: the RAPID STEMI study. *Pharmacogenomics J*. 2016 Feb; 16(1): 71-8.

138. Reese ES, Daniel Mullins C, Beitelshes AL, Onukwugha E. Cost-effectiveness of cytochrome P450 2C19 genotype screening for selection of antiplatelet therapy with clopidogrel or prasugrel. *Pharmacotherapy*. 2012 Apr; 32(4): 323-32.

139. Kazi DS, Garber AM, Shah RU, Dudley RA, Mell MW, Rhee C, et al. Cost-effectiveness of genotype-guided and dual antiplatelet therapies in acute coronary syndrome. *Ann Intern Med*. 2014 Feb 18; 160(4): 221-32.

140. Jiang M, You JH. Cost-effectiveness analysis of personalized antiplatelet therapy in patients with acute coronary syndrome. *Pharmacogenomics*. 2016 May; 17(7): 701-13.

141. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 May; 89(5): 662-73.

142. Verschuren JJ, Trompet S, Wessels JA, Guchelaar HJ, de Maat MP, Simoons ML, et al. A systematic review on pharmacogenetics in cardiovascular disease: is it ready for clinical application? *Eur Heart J*. 2012 Jan; 33(2): 165-75.

143. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Horvath I, Keltai M, Herrman JP, 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 subanalysis of a randomised trial. *Lancet*. 2008 Apr 19; 371(9621): 1353-63.

144. Freeman B, Smith N, Curtis C, Hockett L, Mill J, Craig IW. DNA from buccal swabs recruited by mail: evaluation of storage effects on long-term stability and suitability for multiplex polymerase chain reaction genotyping. *Behav Genet*. 2003 Jan; 33(1): 67-72.

145. Gomez-Martin A, Hernandez AF, Martinez-Gonzalez LJ, Gonzalez-Alzaga B, Rodriguez-Barranco M, Lopez-Flores I, et al. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. *Chemosphere*. 2015 Nov; 139: 534-40.

146. Barrabes JA, Bardaji A, Jimenez-Candil J, del Nogal Saez F, Bodi V, Basterra N, et al. Prognosis and management of acute coronary syndrome in Spain in 2012: the DIOCLES study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015 Feb; 68(2): 98-106.

147. Bergmeijer TO, Janssen PW, Schipper JC, Qaderdan K, Ishak M, Ruitenbeek RS, et al. CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy in ST-segment elevation myocardial infarction patients-Rationale and design of the Patient Outcome after primary PCI (POPular) Genetics study. *Am Heart J*. 2014 Jul; 168(1): 16-22 e1.

148. Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, Stein CM, Hulot JS, Johnson JA, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Aug; 90(2): 328-32.

149. Sibbing D, Gross L, Massberg S. CYP2C19 in ACS Patients: Could Genotyping Have a Role in Medically Managed Patients or Beyond? *J Am Coll*

Cardiol. 2016 Mar 01; 67(8): 948-50.

150. van der Wouden CH, Cambon-Thomsen A, Cecchin E, Cheung KC, Davila-Fajardo CL, Deneer VH, et al. Implementing Pharmacogenomics in Europe: Design and Implementation Strategy of the Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium. Clin Pharmacol Ther. 2017 Mar; 101(3): 341-58.

151. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. Clin Pharmacol Ther. 2013 Sep; 94(3): 317-23.

152. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. Am J Epidemiol. 2009 Feb 15; 169(4): 505-14.



ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I- Procedimiento del genotipado.

El genotipado es el conjunto de procesos encaminados a conseguir determinar la información genética de un organismo, de forma que pueda ser identificado y diferenciado.

El genotipado persigue el análisis de las variaciones individuales que existen en la secuencia genética de un ser vivo. Para realizar un genotipado se utilizan una variedad de técnicas entre las que se incluyen la PCR (para amplificar el material genético), hibridación (para discriminar secuencias homólogas), secuenciación (para determinar la secuencia genética de fragmentos genéticos más o menos largos) y el análisis informático (para realizar operaciones complejas de ensamblado, alineación y anotación genética).

Los diferentes polimorfismos del estudio, SNPs (rs4244285 SNP, **CYP2C19*2**; rs4986893 SNP, **CYP2C19*3**; rs1045642 SNP, **ABCB1**), se genotiparon mediante discriminación alélica utilizando ensayos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real, también llamada PCR cuantitativa (*quantitative real-time PCR*, qPCR). Para ello se utilizaron sondas específicas de hibridación modificadas mediante un ligando de unión al surco menor (*minor groove binder*, MGB) de la marca comercial Life Technologies™ (Foster City, CA), llamadas sondas **TaqMan® MGB**.

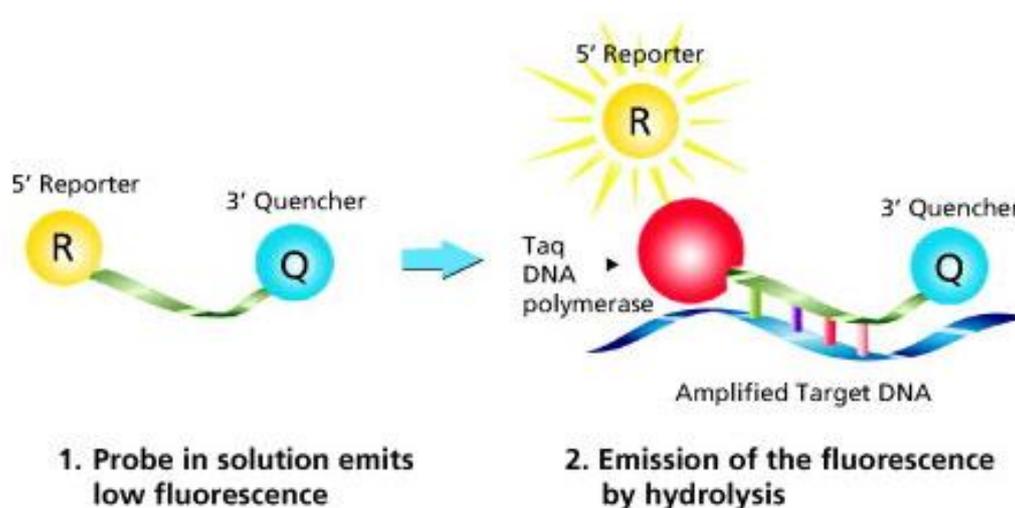
Tecnología TaqMan®

En términos generales, a pesar de las diferencias metodológicas en la detección de SNPs y CNVs, la tecnología de las sondas TaqMan® se basa en aprovechar la actividad exonucleasa 5'→3' de la enzima *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerasa (Taq DNA Polimerasa) para que degrade la sonda de hibridación durante la amplificación por PCR (Lie y Petropoulos, 1998), y en la detección de fluorescencia específica emitida por varias sondas diseñadas para el polimorfismo

a estudiar.

Las sondas TaqMan® son oligonucleótidos con una longitud media de 20 a 30 pares de bases. La sonda intacta tiene unido en su extremo 5' un fluorocromo donador (*reporter*) cuya emisión de fluorescencia está inhibida por la proximidad de una molécula unida al extremo 3' llamada apantallador, inhibidor, apagador o aceptor (*quencher*) no fluorescente (NFQ), debido a un efecto de transferencia de energía tipo Forster (Förster, 1948; Lakowicz, 1983). El espectro de emisión del *reporter* se tiene que solapar con el espectro de absorción del *quencher*. La sonda no puede ser extendida por la Taq DNA Polimerasa ya que su extremo 3' está bloqueado (ver Figura 11).

Figura 1. Estructura de las sondas TaqMan®.

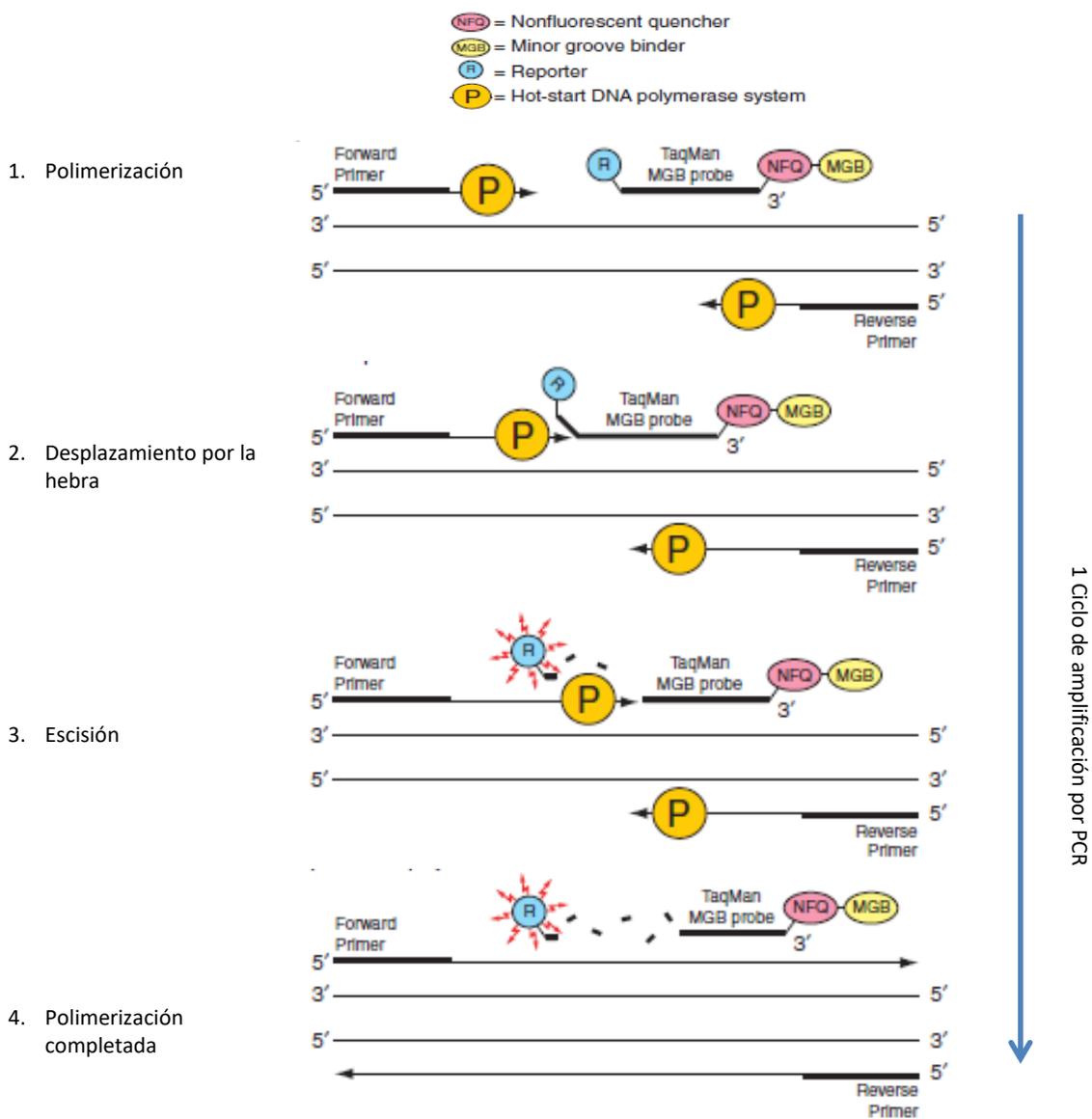


Esta sonda marcada está diseñada para que se hibride por complementariedad de bases con el centro del amplicón o producto de PCR, generado por la extensión de los cebadores, que contiene el polimorfismo de interés. Durante la amplificación por PCR, si la Taq DNA polimerasa se encuentra con la sonda unida a la hebra de DNA que se está extendiendo, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'→3'. La hidrólisis de la sonda hibridada libera el *reporter* unido a su extremo 5' que, al alejarse del *quencher* que lo inhibía por proximidad, emite fluorescencia específica del tipo de fluorocromo (ver Figura 2). La fluorescencia emitida por el

reporter liberado es directamente proporcional a la cantidad de amplicón producido. El incremento de fluorescencia se monitoriza al final de la reacción (PCR de tiempo final) o durante la reacción, en cada uno de los ciclos (qPCR).

El ensayo TaqMan® utiliza parámetros universales de ciclos térmicos y condiciones de la PCR. Estas sondas exigen que no haya una guanina (G) en el extremo 5', Ya que una G adyacente al *reporter* inhibe la fluorescencia incluso tras la hidrólisis.

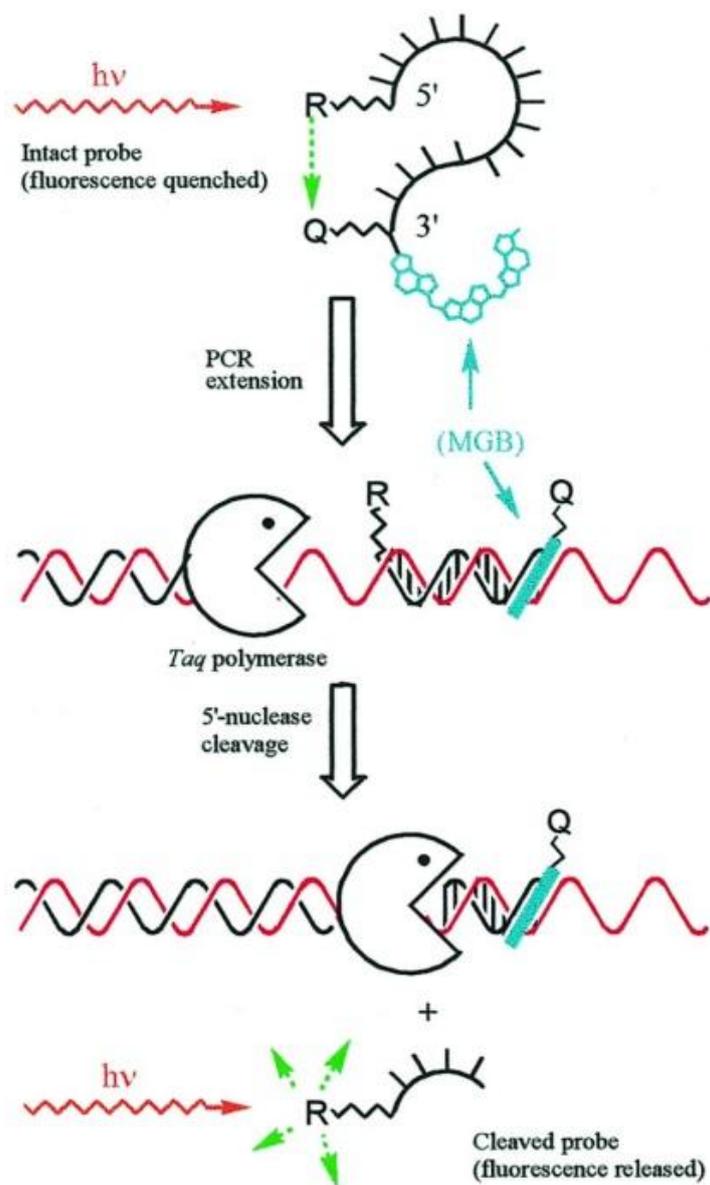
Figura 2. Representación paso a paso del proceso del ensayo exonucleasa 5' de las sondas TaqMan® MGB que tiene lugar en cada ciclo durante la amplificación por



PCR.

Las sondas TaqMan® utilizadas en este estudio están mejoradas debido a que contienen una molécula llamada **ligando de unión al surco menor (MGB)** en el extremo 3', junto al *quencher*. MGB es una pequeña molécula que forma un dúplex extremadamente estable con el surco menor del DNA bicaterio, lo que permite utilizar sondas más cortas en los ensayos basados en hibridación. Cuando la sonda TaqMan® se hibrida por complementariedad perfecta de bases, MGB estabiliza eficazmente la hibridación incorporándose al surco menor del DNA bicatenario formado entre la sonda y la secuencia diana (ver figura 3).

Figura 3. Principio de las sondas TaqMan® MGB



La mayor estabilidad generada aumenta la especificidad de la hibridación, creando una mayor diferencia en la temperatura de *annealing* (T_m) entre sondas complementarias y no perfectamente complementarias. Esta propiedad permite que las sondas TaqMan® MGB sean más cortas (normalmente de 13 a 20 bases) en comparación con las sondas TaqMan® estándar (de 18 a 40 bases), sin afectar a las condiciones del ensayo.

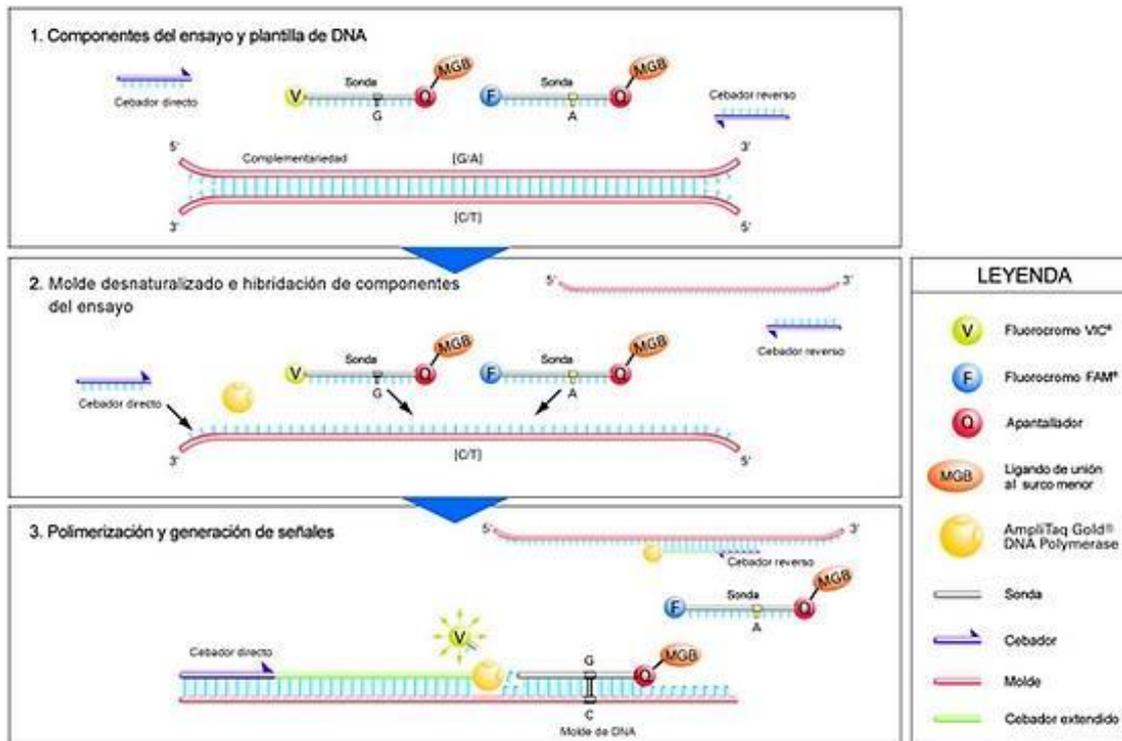
Este tipo de sondas presentan varias ventajas para la qPCR, principalmente para ensayos múltiples. Al mejorar el rendimiento espectral se obtienen resultados más precisos y robustos entre distintos ensayos. Además, la mayor especificidad de la hibridación mejora la discriminación de las dianas. Además, al ser las sondas más pequeñas, se pueden acoplar a amplicones más cortos, tales como las secuencias consenso, lo que aumenta las posibilidades de estudio.

Detección de SNPs

La tecnología TaqMan se puede emplear para el genotipado de SNPs. Este ensayo, denominado *TaqMan® SNP Genotyping Assay* por Life Technologies™, utiliza la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq DNA polimerasa, como más atrás en “**Tecnología TaqMan®**”, junto con dos sondas TaqMan® para discriminar entre los dos alelos de un SNP. Estas sondas TaqMan® son complementarias a cada uno de los dos alelos de un SNP. Cada una tiene un *reporter* en el extremo 5' que emite fluorescencias, cuando está libre, con diferente espectro de excitación y emisión (FAM™ *dye* o VIC® *dye*), y un *quencher* no fluorescente (NFQ) en su extremo 3' junto a una molécula MGB.

Durante la fase de amplificación por PCR, la Taq DNA polimerasa degrada las sondas hibridadas con el DNA, produciéndose la emisión de fluorescencia específica a una de las sondas o a ambas, según el alelo encontrado (ver Figura 4). Esta técnica resulta muy útil en casos en los que el volumen de muestras es elevado y hay que genotipar pocos SNPs, no siendo posible el análisis simultáneo de varios SNPs en una misma reacción de amplificación por PCR.

Figura 4. Esquema del proceso de detección de SNPs mediante sondas TaqMan®



Los ensayos de genotipado de SNPs para determinar el genotipo de muestras desconocidas se pueden realizar mediante PCR de tiempo final y/o qPCR (Figura 8, Figura 9 y Figura 10). Si se utiliza la técnica qPCR se obtiene mayor cantidad de información ya que obteniéndose obtienen datos de la cantidad de fluorescencia en cada ciclo, además de a tiempo final (ver Figura 8, Figura 9 y Figura 10). Los ensayos determinan si las muestras desconocidas que queremos genotipar son:

- **Homocigotos tipo 1:** muestras que sólo tienen el alelo 1 (CC).

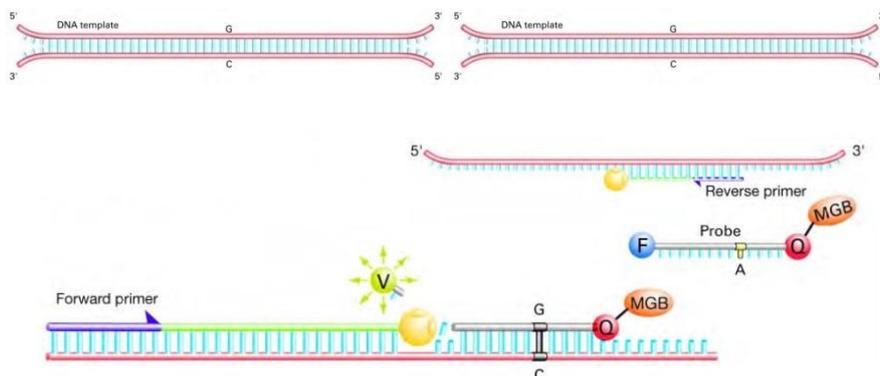


Figura 5. Emisión de fluorescencia VIC® debido a que el individuo es homocigoto

para el alelo C.

- **Homocigotos tipo 2:** muestras que sólo tienen el alelo 2 (TT).

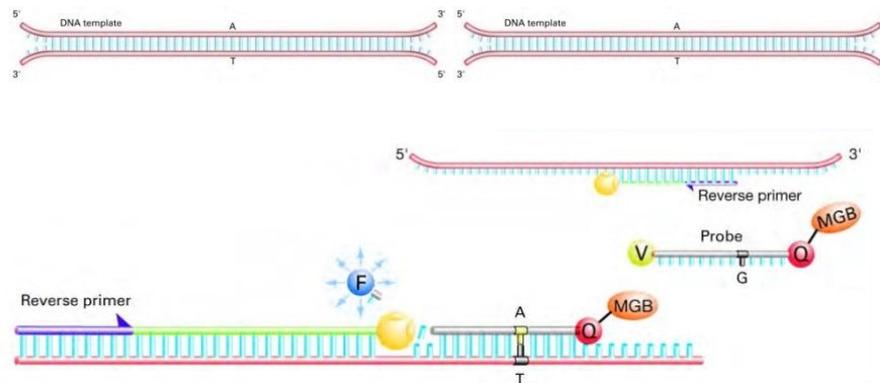


Figura 6. Emisión de fluorescencia FAM™ debido a que el individuo es homocigoto para el alelo T.

- **Heterocigotos:** muestras que tienen el alelo 1 y el alelo 2 (TC).

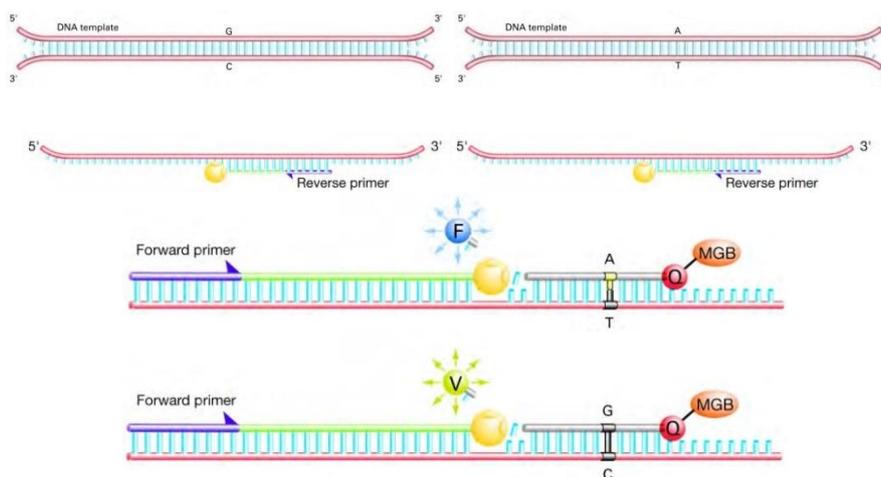


Figura 7. Emisión de fluorescencia VIC® y FAM™ debido a que el individuo es heterocigoto (TC).

La figura 8 representa los datos de fluorescencia obtenidos en la lectura final (post-read) en un grupo de muestras. Los puntos azules, próximos al eje de coordenadas, y los puntos rojos, próximos al eje de abscisas, son cada uno de los homocigotos. Los puntos verdes son los heterocigotos. El NTC, que corresponde a un control sin DNA, está representado con un cuadrado, localizado cerca del cero de fluorescencia.

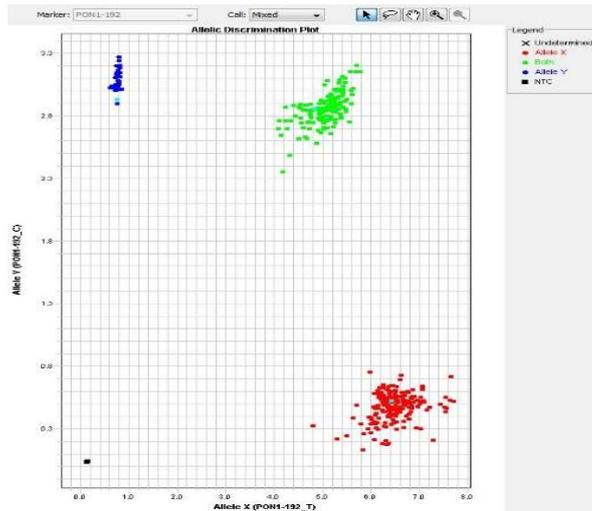


Figura 8. Plot de discriminación alélica

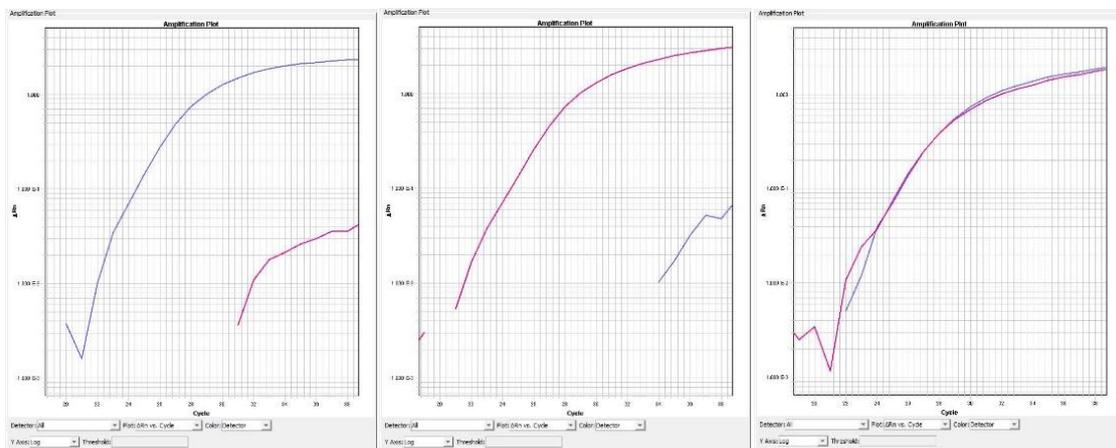


Figura 9. Representación logarítmica de la fluorescencia durante la qPCR en los diferentes genotipos.

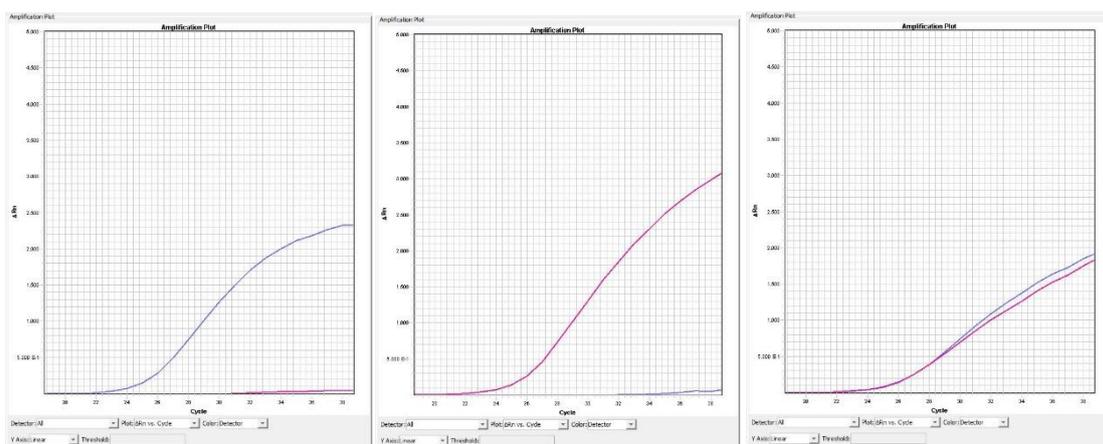


Figura 10. Representación lineal de la fluorescencia durante la qPCR en los diferentes genotipos

La Figura 9 representa de forma logarítmica los datos de fluorescencia obtenidos durante la qPCR de los diferentes genotipos, dos homocigotos y el último el heterocigoto.

La Figura 10 representa de forma lineal los datos de fluorescencia obtenidos durante la qPCR de los diferentes genotipos, dos homocigotos y el último el heterocigoto.

Componentes y Cantidades de PCR

En cada placa para amplificación por PCR es necesario incluir (Ver Figura 11):



Figura 11. Representación esquemática de la localización de cada uno de los tipos de muestras que hay que incluir en una placa óptica para PCR de 384 pocillos.

- **Muestras:** individuos de genotipo desconocido.
- **Réplicas:** corresponde a reacciones con la misma muestra que contienen componentes y volúmenes idénticos. Se replican el 20% del total de muestras.
- **Controles negativos:** muestra que no contiene DNA de ningún individuo pero sí del resto de componentes, denominado NTC (*No Template Control*). Los NTCs

no deberían generar ningún producto de amplificación por PCR. Se añaden 2 por cada SNP estudiado.

- **Controles positivos:** muestras que contienen genotipos conocidos, validados mediante secuenciación por el método Sanger (homocigoto para el alelo 1, homocigoto para el alelo 2 y heterocigoto para los alelos 1 y 2).

Las reacciones de PCR de los ensayos de genotipado incluyen los siguientes componentes:

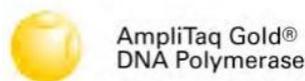
TaqMan® Genotyping Master Mix (Figura 12):

Figura 12. TaqMan® Genotyping Master Mix.



Se compone por los siguientes elementos:

- Enzima **AmpliAq Gold® DNA Polimerasa**, Ultra Pura (UP): es del tipo *hot start*, lo que quiere decir que está inactivada a temperatura ambiente, y requiere de un tiempo inicial de activación que suele ser de 10 min a 95°C. Su función es extender la hebra de DNA a partir de los cebadores hibridados sobre el molde de DNA genómico (gDNA). Mediante su actividad exonucleasa 5'→3' hidroliza las sondas que se han hibridado con su secuencia diana, lo que provoca la separación física del *quencher* con el *reporter*, y por tanto la emisión de fluorescencia de éste último.



- Desoxirribonucleótidos trifosfato (**dNTPs**): necesarios para que la polimerasa realice la extensión en la amplificación por PCR.
- **ROX™ dye**: fluorocromo utilizado como referencia pasiva interna que sirve para normalizar entre las muestras la señal que proviene del *reporter* durante el análisis de los datos, incrementando la precisión en los instrumentos qPCR de Applied Biosystems®. La normalización de la señal (R_n) es necesaria para corregir las fluctuaciones de fluorescencia debido a cambios en la concentración o volumen y se calcula para cada pocillo de la siguiente forma:

$$R_n = \frac{\text{Intensidad de Emisión del Reporter}}{\text{Intensidad de Emisión de la Referencia Pasiva (ROX™)}}$$

- **Buffer**: contiene los componentes de optimización para la amplificación por PCR, necesarios para la correcta discriminación alélica.
- **TaqMan® SNP Genotyping Assay**:
 - ✓ Dos **cebadores** específicos de la secuencia donde está localizado el polimorfismo de interés.

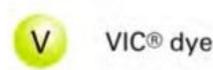


- ✓ Dos sondas **TaqMan® MGB** específicas de locus para detectar sendos alelos del polimorfismo de interés.

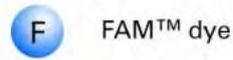


Cada sonda TaqMan® MGB específica de alelo está formada por:

- Un fluorocromo **reporter** en el extremo de 5':
 - Fluorocromo **VIC®**, unido al extremo 5' de la sonda del alelo 1.



- Fluorocromo **FAM™**, unido al extremo 5' de la sonda del alelo 2.



- Una molécula **MGB**, que aumenta la T_m para una longitud de onda determinada, y que permite el diseño de sondas más cortas



- Un **quencher** no fluorescente (NFQ) en el extremo de 3' que permite detectar la fluorescencia del *reporter* con mayor sensibilidad que si fuera un *quencher* fluorescente.

Las cantidades utilizadas para las reacciones de PCR son:

- **DNA genómico (gDNA):** Son necesarios 20 ng de gDNA para una óptima reacción de PCR. Hay dos formas de preparar las muestras a las concentraciones necesarias para realizar los ensayos. Se puede añadir, tras repartir los demás componentes de la reacción de PCR, el mismo volumen de gDNA en estado húmedo con la concentración requerida, para lo cual todas las muestras deben tener la misma concentración. Sin embargo, también está la opción de utilizar gDNA evaporado en el fondo del pocillo, que es técnica que se utilizó en el presente estudio. Para ello se prepararon las muestras en placas de 0,2 mL para PCR de 96 pocillos a concentraciones de 10 ng/ μ L con agua libre de DNasa, y medido por espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/Vis) (Ver el apartado Cuantificación) mediante el instrumental Infinite® 200 NanoQuant (Tecan), teniendo en cuenta el cociente A_{260}/A_{280} para la pureza del gDNA (Haque et al., 2003).

Se añadieron 2 μ L de cada muestra, mediante pipeta electrónica multicanal 1-10 μ L, en el fondo de placas ópticas de 30 μ L para PCR de 384 pocillos (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate, Applied Biosystems®). En muestras cuya concentración es menor de 10 ng/ μ L, se añadió el volumen necesario hasta completar los 20 ng de gDNA necesarios para la reacción de PCR. Posteriormente las placas ópticas de 384, con gDNA en el fondo de cada pocillo, se dejaron secar a temperatura ambiente hasta su completa

evaporación.

Tabla 1. Descripción de los métodos para añadir el gDNA

Método	Descripción	Uso Experimental
gDNA en estado húmedo	<ol style="list-style-type: none"> 1. La mezcla de reacción para genotipado de SNPs es alicuotada en placas ópticas para PCR. 2. Se añade gDNA tras el alicuotado de la mezcla de reacción. <p>Nota: En este método se utiliza el líquido usado para resuspender el gDNA como uno de los componentes de la reacción final.</p>	Análisis de un bajo número de SNPs en un gran número de muestras de gDNA.
gDNA secado en el fondo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se añade gDNA en el fondo de los pocillos de las placas ópticas para PCR. 2. El gDNA se seca completamente por evaporación. 3. A continuación se añade mezcla de reacción de genotipado de SNPs 	<p>Este método se puede utilizar en cualquiera de estas condiciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bajo rendimiento en la concentración de DNA en volúmenes grandes de muestra (2 a 5 μL) para realizar los ensayos. • Número limitado de DNA molde probado repetidamente en diferentes SNPs de estudio. • Número elevado de muestras de DNA preparadas en placas, secadas en el fondo, y almacenadas hasta su uso.

- **Mezcla de reacción:** está compuesta por:
 - TaqMan® Genotyping Master Mix (2X)
 - TaqMan® SNP Genotyping Assay (20X)

- Agua libre de nucleasa

Tabla 2. Preparación de la mezcla para la reacción utilizando el método de gDNA secado en el fondo

Componente	Placa de 384 pocillos
TaqMan® Genotyping Master Mix (2X)	2,50 µL
TaqMan® SNP Genotyping Assay (20X)	0,25 µL
Agua libre de nucleasa	2,25 µL
Volumen total por pocillo	5,00 µL

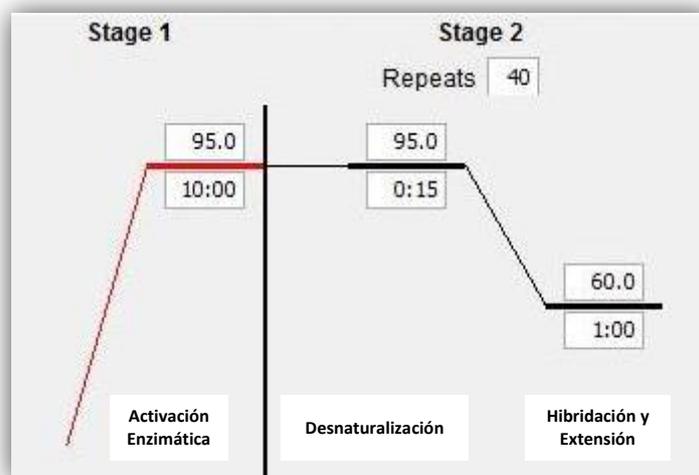
Condiciones de PCR

Las condiciones generales de PCR utilizadas fueron (figura 13): 95 °C durante 10 min para la activación de la Taq polimerasa y para la desnaturalización del DNA. Posteriormente se realizan 40 ciclos de 95 °C y 15 segundos de desnaturalización y 60 °C durante 1 minuto para hibridación y extensión.

Tabla 3. Condiciones generales de termociclador para la reacción de amplificación por PCR para detección de SNPs mediante TaqMan® SNP Genotyping Assay

Paso	TaqMan® SNP Genotyping Assay		
	Tª	Duración	Ciclos
AmpliTaq Gold®, UP, Activación Enzimática	95 °C	10 minutos	1
Denaturalización	95 °C	15 segundos	40
Hibridación y Extensión	60 °C	1 minuto	

Figura 13. Esquema de las condiciones generales de termociclador para la reacción de amplificación por PCR para detección de SNPs mediante TaqMan® SNP Genotyping Assay [Extraído Sequence Detection Software (SDS, versión 2.4)]



Productos TaqMan® SNP Genotyping Assays

A continuación se detallan los diferentes tipos de productos TaqMan® SNP Genotyping Assays diseñados por Life Technologies™ que se han utilizado en el presente estudio:

- TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays
- TaqMan® Drug Metabolism Enzyme (DME) Genotyping Assays
- TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays

8.2 ANEXO II- Hoja de consentimiento informado.

**HOSPITAL UNIVERSITARIO
SAN CECILIO. GRANADA**

**SERVICIOS DE
FARMACIA Y CARDIOLOGÍA**

DOCUMENTO DE INFORMACION PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIO GENÉTICO DE RESISTENCIA AL CLOPIDOGREL

EN QUE CONSISTE:

Los Servicios de Farmacia y Cardiología del Hospital Universitario San Cecilio, conocedores de que se ha descrito que el 30% de la población que necesitan tratamiento antiagregante con CLOPIDOGREL, tienen una resistencia de origen genético al efecto del fármaco, están realizando una determinación y registro de dicha resistencia, mediante el estudio genético apropiado, en colaboración con el centro de investigación GENYO

Los estudios genéticos son procedimientos destinados a detectar variaciones en el ADN, que en su caso podría provocar que el medicamento Clopidogrel no sea beneficioso para usted.

Siendo usted una persona en la que está indicado administrarle clopidogrel, por haber presentado un cuadro de síndrome coronario agudo (Angina de pecho o infarto de miocardio, según el caso) y/o haberle realizado un cateterismo con angioplastia o implantación de stent, y por lo tanto estar indicado el uso de estos fármacos.

Le pedimos su autorización para realizarle el estudio genético, que nos indicará si en su caso hay que modificar el tratamiento antiagregante para conseguir la prevención deseada, y determinar su beneficio.

COMO SE REALIZA:

La determinación genética se realiza a través de una muestra de saliva, que se recoge con una torunda (una especie de chupachups pequeño). El seguimiento posterior es el habitual necesario para el control y seguimiento de su enfermedad, incluyendo dos contactos telefónicos en el año.

QUE EFECTOS LE PRODUCIRÁ: Ninguno

EN QUÉ LE BENFICIARÁ:

El hallazgo de una mutación diagnóstica nos permitirá modificar el tratamiento, para conseguir el efecto deseado en la prevención de la enfermedad coronaria.

OTRAS ALTERNATIVAS EN SU CASO: No existen alternativas a los estudios

genéticos, que obtengan la misma información o similar.

QUÉ RIESGOS TIENE: Ninguno

OTRA INFORMACIÓN: Los resultados del estudio los tendremos antes de su alta hospitalaria, lo que permitirá orientar el tratamiento de manera adecuada.

La muestra quedará en el banco de muestras para utilizarla en otras investigaciones, salvo que usted manifieste de manera específica no querer dejarla.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de Farmacia o Cardiología en el teléfono: 958 023843

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

Yo (Nombre y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)

He podido hacer preguntas sobre el estudio “Determinación del beneficio de genotipar Polimorfismos CYP2C19/ABCB1 en la elección del tratamiento antiagregante (clopidogrel/prasugrel) en pacientes con Síndrome Coronaria Agudo”

He recibido suficiente información sobre el estudio “Determinación del beneficio de genotipar Polimorfismos CYP2C19/ABCB1 en la elección del tratamiento antiagregante (clopidogrel/prasugrel) en pacientes con Síndrome Coronaria Agudo”

He hablado con el profesional sanitario informador:
.....

Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.

- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos. Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera

- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado* “Determinación del beneficio de genotipar Polimorfismos CYP2C19/ABCB1 en la elección del tratamiento antiagregante (clopidogrel/prasugrel) en pacientes con Síndrome Coronaria Agudo”

Firma del paciente
informador

Firma del profesional sanitario

(o representante legal en su caso)

Nombre y apellidos:.....

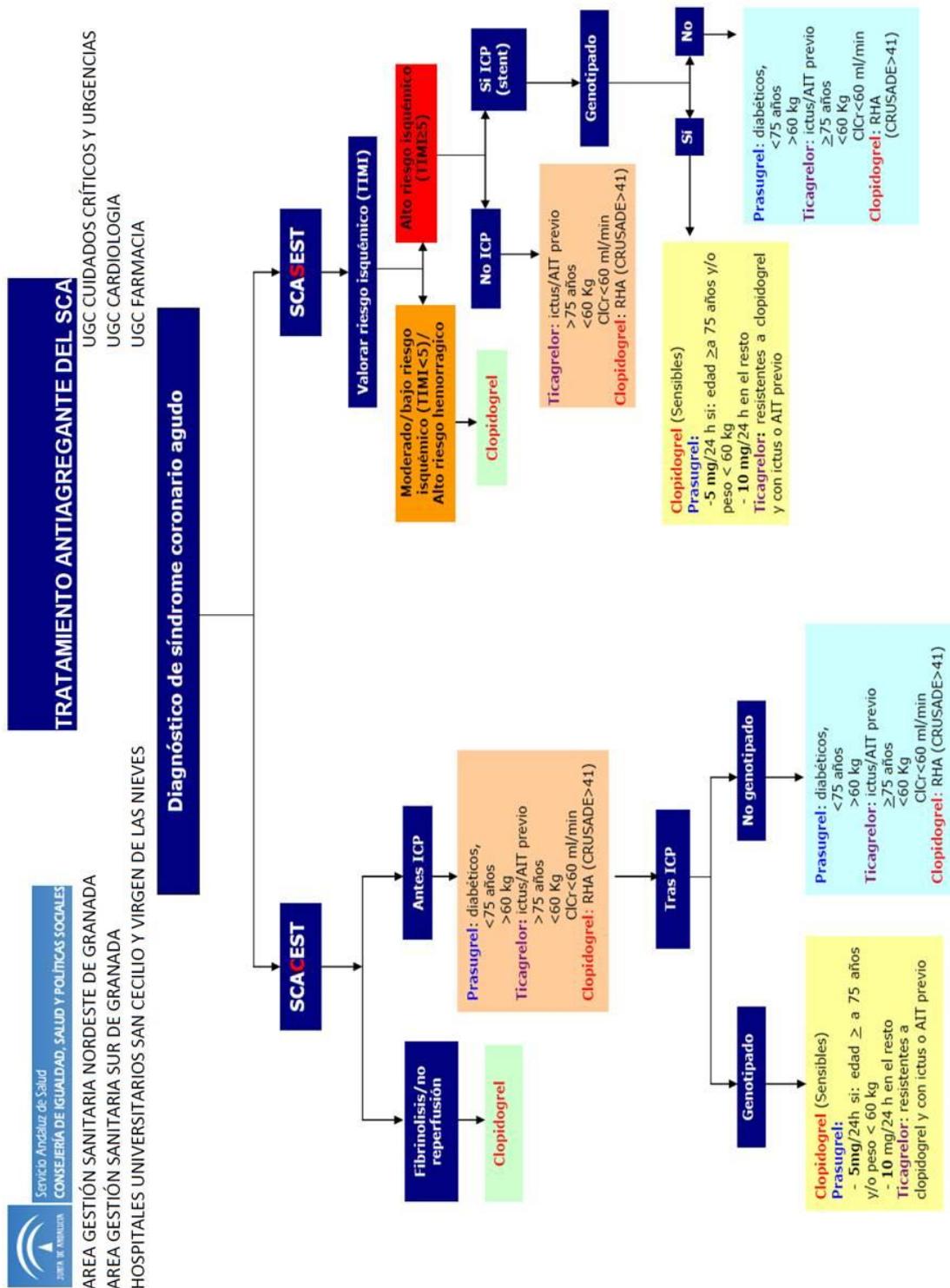
Nombre y apellidos:

.....

Fecha:

Fecha:

8.3 ANEXO III - Algoritmo de elección del tratamiento antagonista P2Y12.



ESCALA CRUSADE DE RIESGO HEMORRAGICO

HEMATOCRITO		TAS mm. Hg.		PUNTOS		Frec. card.		PUNTOS		Aclaramiento		PUNTOS		Otros factores		PUNTOS	
< 31	9	<= 90	10	71-80	1	<= 15	39	Mujer	8								
31-33.9	7	91-100	8	81-90	3	>15-30	35	Insuficiencia cardiaca al ingreso	7								
34-36.9	3	101-120	5	91-100	6	>30-60	28	Diabetes	6								
37-39.9	2	121-180	1	101-110	8	>60-90	17	Enfermedad vascular periferica	6								
		181-200	3	111-120	10	>90-120	7										
		>= 201	5	>= 121	11												
CRUSADE Total																	
PUNTAJUE		<= 20		21 - 30		31 - 40		41 - 50		> 50							
% Riesgo		Muy bajo (3 %)		Bajo (5 % - 8 %)		Moderado (9 % - 11 %)		Alto (11 % - 19 %)		Muy alto (> 19 %)							

Baseline risk of major bleeding in non-ST-segment-elevation myocardial infarction: the CRUSADE. Bleeding Score. Circulation. 2009 Apr 14;119(14):1873-82

ESCALA TIMI DE RIESGO ISQUEMICO

PUNTAJUE RIESGO TIMI para SCA sin elevacion del ST		PUNTOS		PORCENTAJE DE RIESGO DE EVENTOS CARDIACOS EN 14 DIAS	
HISTORIA		Edad mayor e igual 65 años		PUNTAJUE	
Tres o más factores de riesgo cardiovascular. (Iberencia, hiperlipemia, diabetes, tabaquismo, hipertension)		1		3 %	
Estenosis conocida mayor o igual al 50% de una arteria coronaria principal		1		3 %	
Uso de AAS en los siete días previos		1		5 %	
PRESENTACION		Dos o más episodios de angina en las 24 horas previas		1	
Elevación de marcadores cardiacos		1		7 %	
Desviación del ST mayor o igual a 0.5mm		1		12 %	
TIEMI Total		6/7		19 %	
				26 %	
				41 %	
				5 %	
				8 %	
				13 %	
				20 %	
				26 %	
				41 %	

Antman et al JAMA 2000; 284: 835-842

8.4 ANEXO IV- Evaluación favorable del comité de ética.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

**DON MIGUEL ÁNGEL CALLEJA HERNÁNDEZ, EN CALIDAD
DE SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
DE LA PROVINCIA DE GRANADA,**

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado favorablemente, en su reunión celebrada el día 20 de febrero de 2012, el proyecto de investigación titulado: *Pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea en la población española*, siendo la investigadora principal doña Cristina Lucía Dávila Fajardo, y considera que,

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del proyecto.

La capacidad del Investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el proyecto.

Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.

Lo que firmo en Granada, a seis de marzo de dos mil doce.