



Universidad de Granada

FACULTAD DE FARMACIA

Programa oficial de doctorado en Farmacia

TESIS DOCTORAL

POLIMORFISMOS *CYP2C19* Y *ABCB1* EN EL
TRATAMIENTO ANTIAGREGANTE CON CLOPIDOGREL EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA
SOMETIDOS A ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL
PERCUTÁNEA, ICTUS O ACCIDENTE ISQUÉMICO
TRANSITORIO

Doctorando:

Xando Díaz Villamarín

Directora de la tesis:

Dra. Cristina Lucía Dávila Fajardo

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Xando Díaz Villamarín
ISBN: 978-84-1306-039-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54312>

COMUNICACIONES Y ARTICULOS PRODUCIDOS

– ARTÍCULO CIENTÍFICO:

Título: GENETIC POLYMORPHISMS INFLUENCE ON THE RESPONSE TO CLOPIDOGREL IN PERIPHERAL ARTERY DISEASE PATIENTS FOLLOWING PERCUTANEOUS TRANSLUMINAL ANGIOPLASTY.

Autores: Xando Díaz Villamarín; Cristina Lucía Dávila Fajardo; Luis Javier Martínez González; Pedro Carmona Sáez; Jesús Sánchez Ramos; María Jesús Álvarez Cubero; Luis Miguel Salmerón Febres; José cabeza Barrera; Fidel Fernández Quesada.

Referencia: Díaz-Villamarín *et al.* Genetic polymorphisms influence on the response to clopidogrel in peripheral artery disease patients following percutaneous transluminal angioplasty. *Pharmacogenomics*. 17 - 12, pp. 1327 - 1338. Future Medicine LTD, 27/07/2016.

ISSN: 1462-2416 **DOI:** 10.2217/pgs-2016-0056 **PMID:** 27464309

– COMUNICACIONES A CONGRESO INTERNACIONAL CON PUBLICACIÓN ASOCIADA:

Título del trabajo: IMPLEMENTING CYP2C19 GENOTYPING IN OUR DAILY CLINICAL PRACTICE.

Nombre del congreso: 46 ESCP Symposium on Clinical Pharmacy

Ciudad y año de celebración: Heidelberg (Alemania) - 2017

Entidad organizadora: European Society of Clinical Pharmacy

Autores: Cristina Lucía Dávila Fajardo; Xando Díaz Villamarín; David Blánquez Martínez; Álvaro Caballero Romero; Alba Antúnez Rodríguez; Manuel Pérez Campos; Pelayo Nieto Gómez; Luis Javier Martínez González; José Cabeza Barrera.

Publicado en: International Journal of Clinical Pharmacy. 40 - 1, pp. 256 - 256.
Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2017,
08/12/2017.

ISSN: 2210-7703 **DOI:** 10.1007/s11096-017-0565-9

Título del trabajo: INFLUENCE OF SURGICAL STRATEGY AND BASELINE CONDITIONS VERSUS CYP2C19 POLYMORPHISMS IN ANTIPLATELET RESPONSE TO CLOPIDOGREL IN PATIENTS UNDERGOING PERCUTANEOUS TRANSLUMINAL ANGIOPLASTY

Nombre del congreso: EAHP 22st Annual Congress

Ciudad y año de celebración: Cannes (Francia) - 2017

Entidad organizadora: European Association of Hospital Pharmacists (EAHP)

Autores: Lorenzo Villalobos Torres; Xando Díaz Villamarín; Cristina Lucía Dávila Fajardo; Margarita Valle Corpas; José Cabeza Barrera.

Publicado en: European Journal of Hospital Pharmacy. 24 - supp 1, pp. A5 - A5. BMJ Publishing Group LTD, 01/03/2017.

ISSN: 2047-9956 **DOI:** 10.1136/ejhpharm-2017-000640.11

Título del trabajo: CYP2C19*2, *3 POLYMORPHISMS IN THE RESPONSE TO CLOPIDOGREL AFTER PERCUTANEOUS TRANSLUMINAL ANGIOPLASTY OR STROKE

Nombre del congreso: 45 ESCP Symposium on Clinical Pharmacy

Ciudad y año de celebración: Oslo (Noruega) - 2016

Entidad organizadora: European Society of Clinical Pharmacy

Autores: Xando Díaz Villamarín; Cristina Lucía Dávila Fajardo; Luis Javier Martínez González; Alejandro Rodríguez Delgado; Inmaculada Villegas Rodríguez; José Cabeza Barrera.

Publicado en: International Journal of Clinical Pharmacy. 39 - 1, pp. 338 - 338.
Springer International Publishing, 10/01/2017.

ISSN: 2210-7703 DOI: 10.1007/s11096-016-0404-4

Título del trabajo: PHARMACOGENETICS IN ANTIPLATELET TREATMENT WITH CLOPIDOGREL IN VASCULAR PATHOLOGY

Nombre del congreso: EAHP 20th Annual Congress

Ciudad y año de celebración: Hamburgo (Alemania) - 2015

Entidad organizadora: European Association of Hospital Pharmacists (EAHP)

Autores: Cristina Lucía Dávila Fajardo; Xando Díaz Villamarín; Fidel Fernández Quesada; Luis Javier Martínez González; Jesús Gabriel Sánchez Ramos; Susana Martínez Huertas; María Carmen Marín Guzmán; José Cabeza Barrera.

Publicado en: European Journal of Hospital Pharmacy. 22 - supp 1, BMJ Publishing Group Ltd, 02/03/2015.

ISSN: 2047-9956 DOI: 10.1136/ejhpharm-2016-000875.417

Título del trabajo: INFLUENCE OF THE GENETIC POLYMORPHISMS ON THE RESPONSE TO CLOPIDOGREL IN PERIPHERAL ARTERY DISEASE PATIENTS FOLLOWING PERCUTANEOUS TRANSLUMINAL ANGIOPLASTY

Nombre del congreso: EAHP 21st Annual Congress

Ciudad y año de celebración: Viena (Austria) - 2016

Entidad organizadora: European Association of Hospital Pharmacists (EAHP)

Autores: Cristina Lucía Dávila Fajardo; Xando Díaz Villamarín; Luis Javier Martínez González; Pedro Carmona Sáez; Jesús Gabriel Sánchez Ramos; Luis Miguel Salmerón Febres; Fidel Fernández Quesada; Inmaculada Casas Hidalgo; Margarita Valle Corpas.

Publicado en: European Journal of Hospital Pharmacy. 23 - supp 1, pp. A184 - A184. BMJ Publishing Group LTD, 01/03/2016.

ISSN: 2047-9956 DOI: 10.1136/ejhpharm-2016-000875.417

– COMUNICACIONES A CONGRESO NACIONAL CON/SIN PUBLICACIÓN ASOCIADA:

Título del trabajo: COMPARATIVA DE LA INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS CYP2C19 Y ABCB1 EN EL TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL EN PACIENTES CON PATOLOGÍA VASCULAR PERIFERICA Y PACIENTES TRAS ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

Nombre del congreso: 61 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria

Ciudad y año de celebración: Gijón (Principado de Asturias) - 2016

Entidad organizadora: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH)

Autores: Xando Díaz Villamarín; Cristina Lucía Dávila Fajardo; Inmaculada Casas Hidalgo; Andrea Trueba Argamasilla; Inmaculada Villegas Rodríguez; Fidel Fernández Quesada.

Publicado en: Farmacia Hospitalaria. 40 - Supl 1, pp. 262 - 263. VisionNet. 2016.

ISBN: 978-84-617-5735-0 **Depósito legal:** M-39256-2016

Título del trabajo: INFLUENCIA DE VARIABLES CLÍNICAS FRENTE PRESENCIA CYP2C19*2*3 EN LA RESPUESTA A CLOPIDOGREL EN PACIENTES SOMETIDOS A ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÁNEA

Nombre del congreso: 61 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria

Ciudad y año de celebración: Gijón (Principado de Asturias) - 2016

Entidad organizadora: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH)

Autores: Xando Díaz Villamarín; Lorenzo Villalobos Torres; Cristina Lucía Dávila Fajardo; Rocío Morón Romero; María del Carmen González Medina; José Cabeza Barrera.

Publicado en: Farmacia Hospitalaria. 40 – Supl 1, pp. 70 - 71. VisionNet, 2016.
ISBN: 978-84-617-5735-0 **Depósito legal:** M-39256-2016

Título del trabajo: POLIMORFISMO CYP2C19*2 EN EL TRATAMIENTO ANTIAGREGANTE TRAS ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

Nombre del congreso: 61 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria

Ciudad y año de celebración: Gijón (Principado de Asturias) - 2016

Entidad organizadora: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH)

Autores: Xando Díaz Villamarín; Joaquín Urda Romacho; Cristina Lucía Dávila Fajardo; Margarita Valle Corpas; Inmaculada Villegas Rodríguez; Juan de Dios Fernández Ortega.

Publicado en: Farmacia Hospitalaria. 40 - Supl 1:18, pp. 282 - 282. VisionNet, 2016.

ISBN: 978-84-617-5735-0 **Depósito legal:** M-39256-2016

Título del trabajo: VARIACIONES GENÉTICAS ASOCIADAS A LA RESPUESTA DE CLOPIDOGREL (EVENTOS ISQUÉMICOS, ÍNDICE TOBILLO BRAZO Y DISTANCIA DE CLAUDICACIÓN) EN PACIENTES CON PATOLOGÍA VASCULAR PERIFÉRICA SOMETIDOS A ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÁNEA

Nombre del congreso: 60 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria

Ciudad y año de celebración: Valencia (Comunidad Valenciana) - 2015

Entidad organizadora: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH)

Autores: Xando Díaz Villamarín; Cristina Lucía Dávila Fajardo; Luis Javier Martínez González; Fidel Fernández Quesada; Lara Papay Ramírez; Jesús Gabriel Sánchez Ramos.

Publicado en: Libro de comunicaciones científicas. pp. 305 - 306. VisionNet, 2015.

ISBN: 978-84-606-6828-2 Depósito legal: M-38222-2015

Título del trabajo: INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS EN LA RESPUESTA A CLOPIDOGREL EN PACIENTES CON PATOLOGIA VASCULAR PERIFERICA SOMETIDOS A ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÁNEA *

Nombre del congreso: VII Congreso de la Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica

Ciudad y año de celebración: Madrid (Comunidad de Madrid) - 2015

Entidad organizadora: Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica (SEFF)

Autores: Xando Díaz Villamarín; Cristina Lucía Dávila Fajardo; Cristobal Gallego Muñoz; Fidel Fernández Quesada; Luis Javier Martínez González; Jesús Gabriel Sánchez Ramos; María José Gándara Ladrón de Guevara; Susana Martínez Huertas; Francisco Burillo Gómez; Belén Martínez García; Antonio Gómez Martín; María Carmen Marín Guzmán.

*** PREMIO**

Descripción: Mejor comunicación oral VII Congreso de la SEFF

Entidad concesionaria: Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica (SEFF)

Fecha de concesión: 21/04/2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a los pacientes, que amable y desinteresadamente dieron su consentimiento para participar en este estudio y a los profesionales sanitarios de los diferentes centros y servicios que directa o indirectamente colaboraron para llevar a fin este proyecto. En especial a los compañeros del servicio de cirugía vascular, cardiología, neurología y documentación clínica del Hospital Universitario San Cecilio, y sobre todo a los doctores Fidel Fernández Quesada, Inmaculada Villegas Rodríguez y Jesús Sánchez Ramos.

Al jefe de la unidad de Farmacia, D. José Cabeza Barrera, por su apuesta por la investigación pública y por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

A la Dra. Cristina Lucía Dávila Fajardo, directora de esta tesis doctoral, por su confianza, su amistad, por su excelente nivel profesional y ético; y, sobre todo, por su dedicación ejemplar y esfuerzo diario por poner en valor y aumentar el nivel de la investigación clínica.

A los compañeros de la farmacia del Hospital San Cecilio; farmacéuticos, residentes, enfermeros, auxiliares, administrativos, celadores y limpiadoras; a todos, por su simpatía, amabilidad, esfuerzo diario en su trabajo y dedicación a los demás.

A los compañeros de GENYO. A Jose y Fernando por su ayuda y colaboración diaria, y especialmente, a todos los que componen la unidad de Genómica: Luis Javier, Belén, Antonio, Alba, Ana, Esperanza y todos los alumnos de máster, doctorandos o técnicos que he podido conocer durante estos años. Gracias por vuestra simpatía, colaboración desinteresada, excelente asistencia técnica y asesoramiento científico.

A mis amigos, que evito agradecer individualmente porque no serían suficientes las páginas. Gracias por vuestra amistad, en las buenas y en las malas, por vuestro consejo y compañía.

También, a la familia Álvarez Lloret. Gracias por los cachopos, albóndigas, potes gallegos, tardes en Carro, en el Sauco, fines de semana en Cádiz o vacaciones en Asturias. Por vuestro apoyo y simpatía, gracias.

A toda mi familia, por formar un clan tan particular, gracias por todo. A mi padre y a mis hermanos, por su inquietud, confianza, cariño y admiración mutua.

Por último, a mi madre y al Dr. Ballester, por creer en mi, ayudarme y empujarme en todo lo que hago.

A mis abuelos.

TESIS DOCTORAL

POLIMORFISMOS *CYP2C19* Y *ABCB1* EN EL
TRATAMIENTO ANTIAGREGANTE CON CLOPIDOGREL EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA
SOMETIDOS A ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL
PERCUTÁNEA, ICTUS O ACCIDENTE ISQUÉMICO
TRANSITORIO



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Doctorando:

Xando Díaz Villamarín

Directora de la tesis:

Dra. Cristina Lucía Dávila Fajardo

RESUMEN ESTRUCTURADO

– Introducción:

El clopidogrel es un profármaco cuyo metabolito activo ha demostrado su eficacia como antiagregante en la prevención de eventos cardiovasculares mayores secundarios a síndrome coronario agudo, enfermedad arterial periférica y cerebrovascular.

Para la obtención de su metabolito activo, clopidogrel se metaboliza a nivel hepático principalmente por la enzima CYP2C19, y su absorción depende en parte de la glicoproteína-P, cuya expresión está codificada por el gen *ABCB1*.

La presencia de los polimorfismos *CYP2C19*2*, **3*, **17* y *ABCB1 C3435T* en pacientes con síndrome coronario agudo sometidos a una intervención coronaria percutánea, se asoció a una respuesta antiagregante variable en el tratamiento con clopidogrel.

En pacientes con enfermedad arterial periférica o enfermedad cerebrovascular, en los que clopidogrel demostró también su eficacia, la evidencia científica es más deficiente para esta asociación al no haber suficientes estudios publicados, además, los pocos que existen muestran resultados contradictorios.

– Objetivo:

Estudiar la influencia de los polimorfismos *CYP2C19*2*, **3*, **17* y *ABCB1 3435C>T* sobre la eficacia del clopidogrel en pacientes con enfermedad arterial periférica y en pacientes con enfermedad cerebrovascular.

– Metodología:

Se realizaron 2 estudios: uno con pacientes con enfermedad arterial periférica de miembros inferiores sometidos a una angioplastia transluminal

percutánea, y otro con pacientes diagnosticados de ictus o accidente isquémico transitorio. En ambos, los pacientes fueron tratados con clopidogrel desde la cirugía y desde el diagnóstico respectivamente. Se genotipó la presencia de los polimorfismos *CYP2C19*2*, **3*, **17* y *ABCB1 C3435T* en los pacientes reclutados y se estudió su asociación con la eficacia del clopidogrel. Como variables respuesta (eficacia), en pacientes con enfermedad arterial periférica sometidos a angioplastia transluminal percutánea se estudió la ocurrencia de eventos isquémicos en el miembro intervenido durante el tratamiento con clopidogrel en 12 meses de seguimiento, y en los pacientes con ictus o accidente isquémico transitorio se estudió como evento primario la ocurrencia de infarto agudo de miocardio, ictus o muerte cardiovascular desde el diagnóstico, durante el tiempo de tratamiento con clopidogrel, hasta el 31 de julio de 2017.

– Resultados:

En pacientes con enfermedad arterial periférica y angioplastia transluminal percutánea tratados con clopidogrel, la presencia del polimorfismo *CYP2C19*2* se asoció de manera independiente (OR=4.89; IC 95%=1.32-12.83; p=0.018) y combinado con el genotipo *ABCB1 3435TT* (OR=4.66; IC 95%=1.37-15.84; p=0.014), con un aumento del riesgo de sufrir un evento isquémico en el miembro intervenido.

Además, en estos pacientes, se relacionó significativamente la presencia de estos polimorfismos con la mala evolución de la clasificación de Fontaine, ondas pletismográficas y distancia de claudicación.

En pacientes con ictus o accidente isquémico transitorio tratados con clopidogrel, la presencia del *CYP2C19*2* mostró una asociación estadísticamente significativa con el aumento del riesgo de la combinada de ictus o accidente isquémico transitorio, infarto agudo de miocardio y muerte cardiovascular (evento primario) (OR=5.07; IC95%=1.2-21.45; p=0.023).

Por otro lado, en estos pacientes, se asoció la presencia del *CYP2C19*17* con la protección frente la aparición del evento primario (OR=0.19; IC95%=0.03-1.09; p=0.037).

– Conclusiones:

Los polimorfismos *CYP2C19*2* y *ABCB1 3435C>T* pueden ser marcadores genéticos de la aparición de eventos isquémicos en pacientes andaluces con enfermedad arterial periférica y sometidos a angioplastia transluminal percutánea tratados con clopidogrel.

El polimorfismo *CYP2C19*2* puede ser un marcador de la aparición de eventos cardiovasculares mayores en pacientes con ictus o accidente isquémico transitorio tratados con clopidogrel, mientras, el *CYP2C19*17* puede ser indicador de la prevención frente la aparición de estos eventos entre estos pacientes.

ÍNDICE DE CAPITULOS

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	17 - 60
1. ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA	22
1.1 FACTORES DE RIESGO	23
1.2 DIAGNÓSTICO	24
1.3 TRATAMIENTO	27
2. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	30
2.1 FACTORES DE RIESGO	30
2.2 DIAGNÓSTICO	31
2.3 TRATAMIENTO	32
3. CLOPIDOGREL	35
4. FARMACOGENÉTICA	40
5. CITOCROMO P450	44
5.1 CYP2C19	46
6. ABCB1	50
7. POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA RESPUESTA A CLOPIDOGREL	53
7.1 IMPORTANCIA CLÍNICA	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61 - 66
1. HIPÓTESIS	63
2. OBJETIVOS	65
2.1 OBJETIVO PRIMARIO	65
2.2 OBJETIVO SECUNDARIO	65
MATERIAL Y MÉTODOS	67 - 102
1. ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA Y ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÁNEA	69
1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	69
1.2 CÁLCULO MUESTRAL	69
1.3 PACIENTES Y TRATAMIENTO	70
1.3.1 Población de estudio	
1.3.2 Reclutamiento	

1.3.3 Criterios de inclusión	
1.3.4 Criterio de exclusión	
1.4 EVALUACIÓN CLÍNICA	71
1.4.1 Variables Respuesta (Dependientes)	
1.4.2 Variables genéticas (Independientes)	
1.4.3 Covariables	
1.5 METAANÁLISIS	79
2. ICTUS O ACCIDENTE ISQUÉMICO TRANSITORIO	80
2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	80
2.2 CÁLCULO MUESTRAL	80
2.3 PACIENTES Y TRATAMIENTO	80
2.3.1 Población de estudio	
2.3.2 Reclutamiento	
2.3.3 Criterios de inclusión	
2.3.4 Criterios de exclusión	
2.4 EVALUACIÓN CLÍNICA	82
2.4.1 Variable Respuesta (Dependiente)	
2.4.2 Variables genéticas (Independientes)	
2.4.3 Covariables	
3. CIRCUITO DE PACIENTES Y PROCEDIMIENTO	87
3.1 INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	87
3.2 TOMA DE MUESTRAS	88
3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	89
3.4 EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO	89
4. EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO	90
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	96
5.1 METAANÁLISIS	98
5.2 EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG	98
6. ASPECTOS ÉTICOS Y DEONTOLÓGICOS	100

RESULTADOS

1. ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA Y ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÁNEA	105
1.1 RECLUTAMIENTO	105
1.2 CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN	106
1.2.1 Variables clínicas.	
1.2.2 Variables relacionadas con el tratamiento	
1.2.3 Variables relacionadas con la cirugía.	
1.2.4 Variables genéticas	
1.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE COVARIABLES Y POLIMORFISMOS/RESPUESTA	111
1.4 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EVENTO PRIMARIO Y POLIMORFISMOS (OBJETIVO PRIMARIO)	116
1.5 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EVENTOS SECUNDARIOS Y POLIMORFISMOS (OBJETIVO SECUNDARIO)	122
1.6 METAANÁLISIS EN PACIENTES CON EAP SOMETIDOS A ATP	123
2. ICTUS O ACCIDENTE ISQUÉMICO TRANSITORIO	125
2.1 RECLUTAMIENTO	125
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN	126
2.2.1 Variables clínicas y factores de riesgo	
2.2.2 Variables relacionadas con el tratamiento	
2.2.3 Variables genéticas	
2.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE COVARIABLES Y POLIMORFISMOS/RESPUESTA	129
2.4 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EVENTO PRIMARIO Y POLIMORFISMOS	133

DISCUSIÓN

1. ASPECTOS RELEVANTES Y NOVEDADES QUE APORTA ESTE TRABAJO	141
2. COMPARACIÓN CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN SCA	145
3. COMPARACIÓN DE DISEÑO Y RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS (EAP/ECV)	147
4. RELEVANCIA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA	152
5. LIMITACIONES	155
6. IMPLICACIONES EN OTRAS ÁREAS DE CONOCIMIENTO	158

	PÁGINA
CONCLUSIONES	161-164
ANEXOS	165-174
ANEXO 1: Aprobación del comité de ética de investigación biomédica de la provincia de Granada para el estudio en pacientes con enfermedad arterial periférica.	167
ANEXO 2: Hoja de información al paciente y consentimiento informado para el estudio en pacientes con enfermedad arterial periférica.	169
ANEXO 3: Aprobación del comité de ética de investigación biomédica de la provincia de Granada para el estudio en pacientes con ictus o accidente isquémico transitorio.	171
ANEXO 4: Hoja de información al paciente y consentimiento informado para el estudio en pacientes con ictus o accidente isquémico transitorio.	173
BIBLIOGRAFÍA	175-202

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
TABLA 1	Clasificación de Leriche-Fontaine	26
TABLA 2	Estrategia terapéutica en ECV	33
TABLA 3	Variantes <i>CYP2C19</i> con influencia en la respuesta a fármacos	47
TABLA 4	Polimorfismos <i>CYP2C19</i> con relevancia clínica	45
TABLA 5	Polimorfismos en el gen <i>ABCB1</i> con frecuencia > 0.01 en alguna población	51
TABLA 6	Estudios sobre la influencia de polimorfismos <i>CYP2C19</i> en la respuesta a clopidogrel en pacientes con ictus o AIT	57
TABLA 7	Recomendaciones terapéuticas en el tratamiento con clopidogrel en función del genotipo <i>CYP2C19</i>	58
TABLA 8	Clasificación en niveles de la distancia de claudicación	73
TABLA 9	Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre los pacientes reclutados (EAP con ATP) y las poblaciones de referencia	110
TABLA 10	Características basales de la población (EAP) y su relación con los polimorfismos estudiados (EAP)	113-114
TABLA 11	Características basales de la población (EAP) y su relación con el evento primario	115
TABLA 12	Asociación entre polimorfismos y el evento primario (chi cuadrado) en pacientes con EAP	118
TABLA 13	Asociación entre polimorfismos y el evento primario (Cox) en pacientes con EAP	118
TABLA 14	Asociación entre polimorfismos y variables clínicas de evolución (objetivo secundario)	122
TABLA 15	Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre los pacientes reclutados (ictus/AIT) y las poblaciones de referencia	128
TABLA 16	Características basales de la población (ictus/AIT) y su relación con los polimorfismos estudiados	130

TABLA 17	Características basales de la población (ictus/AIT) y su relación con el evento primario	132
TABLA 18	Asociación entre polimorfismos y el evento primario en pacientes con ictus/AIT	134
TABLA 19	Asociación entre polimorfismos y el evento primario en pacientes con ictus/AIT (Multivariante)	135

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

		PÁGINA
ILUSTRACIÓN 1	Metabolismo del clopidogrel	36
ILUSTRACIÓN 2	Extracción de ADN	91
ILUSTRACIÓN 3	Principios del funcionamiento de las sondas <i>Taqman</i> [®]	93
ILUSTRACIÓN 4	Principios del funcionamiento del genotipado de polimorfismos mediante el uso de sondas <i>Taqman</i> [®]	94
ILUSTRACIÓN 5	Representación gráfica de los resultados del genotipado por sondas <i>Taqman</i> [®] ("plot")	95

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
FIGURA 1	Reacciones de biotransformación de fármacos	45
FIGURA 2	Pacientes reclutados con EAP	105
FIGURA 3	Curva de supervivencia (censura: evento isquémico) en EAP	119
FIGURA 4	Curva de supervivencia en función de CYP2C19 LOF en EAP	120
FIGURA 5	Curva de supervivencia en función de ABCB1 LOF en EAP	120
FIGURA 6	Curva de supervivencia en función de CYP2C19 GOF en EAP	121

FIGURA 7	Curva de supervivencia en función de LOF combinado (CYP2C19+ABCB1) en EAP	121
FIGURA 8	Análisis combinado en pacientes con EAP: Forest plot que indica OR e IC95% de la asociación del CYP2C19*2 y evento isquémico	124
FIGURA 9	Análisis combinado en pacientes con EAP: Forest plot que indica OR e IC95% de la asociación del CYP2C19*2 y necesidad de reoperación en el miembro afectado	124
FIGURA 10	Pacientes reclutados con ictus o AIT	125
FIGURA 11	Curva de supervivencia (censura: IAM, ictus/AIT, muerte CV) en ictus/AIT	135
FIGURA 12	Curva de supervivencia en función de CYP2C19 LOF en ictus/AIT	136
FIGURA 13	Curva de supervivencia en función de CYP2C19 GOF en ictus/AIT	136
FIGURA 14	Curva de supervivencia en función de ABCB1 LOF en ictus/AIT	137
FIGURA 15	Curva de supervivencia en función de LOF (CYP2C19 y ABCB1 combinados) en ictus/AIT	137

ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ACV	Accidente cerebrovascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín fosfato
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
AIT	Accidente isquémico transitorio
ARAI	Antagonistas de los receptores de la angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BL	<i>"Baseline"</i> (Estado basal)
cHDL	Colesterol <i>"high density lipoprotein"</i>
Ci	Claudicación intermitente
CI	Consentimiento informado
CITAWEB	Diraya citación
cLDL	Colesterol <i>"low density lipoprotein"</i>
GPIIb-IIIa	Complejo IIB-IIIa de la glicoproteína plaquetaria
CPIC	<i>"Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium"</i>
cSNP	<i>"Single Nucleotid Polymorphisms"</i> en la región codificadora
CV	Cardiovascular
CYP	Citocromo P450
DAE	Diraya de Atención Especializada
DBSNP RS	<i>"Single nucleotid Polymorphism database" rs</i>
DC	Distancia de claudicación
DPWG	<i>"Dutch Pharmacogenetics Working Group"</i>
DTC	<i>Doppler</i> transcraneal
DTSA	<i>Doppler</i> de troncos supra-aórticos
EAP	Enfermedad arterial periférica
EC	Enfermedad cardiológica
ECG	Electrocardiograma
ECV	Enfermedades cerebrovasculares

EM	<i>"Extensive metabolizer"</i> (Metabolizador normal)
EVP	Enfermedad vascular periférica
FA	Fibrilación auricular
GA	<i>"Grant agreement"</i>
GENYO	Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía - de Genómica e Investigación Oncológica
GOF	<i>"Gain of function"</i> (Ganancia de función)
HBPM	Heparinas de bajo peso molecular
HR	Hazard ratio
HTA	Hipertensión arterial
HUSC	Hospital clínico Universitario San Cecilio
IAM	Infarto agudo de miocardio
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
IC 95%	Intervalo de confianza al 95%
ICH	<i>"International Conference of Harmonisation"</i>
ICP	Intervención coronaria percutánea
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IM	<i>"Intermediate metabolizer"</i> (Metabolizador intermedio)
ITB	Índice tobillo-brazo
LOF	<i>"Loss of function"</i> (Pérdida de función)
MDR1	<i>"Multidrug resistance protein 1"</i>
NNT	Número necesario de tratar
NUHSA	Número Único de Historia de Salud de Andalucía
OR	Odds ratio
pb	Pares de bases
PCR	<i>"Polimerase Chain Reaction"</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PTS	Parque Tecnológico de la Salud
PVR	<i>"Pulse Volume Record"</i>
qPCR	<i>Quantitative real-time PCR</i> (PCR en tiempo real)
RR	Riesgo relativo
RRR	Reducción del riesgo relativo
SAS	Servicio Andaluz de Salud
SCA	Síndrome coronario agudo

SCACEST	Síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST
SCASEST	Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST
SNP	<i>"Single Nucleotid Polymorphisms"</i> (Polimorfismos de un único nucleótido)
Taq DNA polimerasa	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerasa
TC craneal	Tomografía computarizada craneal
TEA	Tromboendarterectomía
UM	<i>"Ultrarapid metabolizer"</i> (Metabolizador ultrarrápido)
U-PGx	<i>"Ubiquitous pharmacogenomics"</i>
UV	Espectro ultravioleta



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Desde la publicación de los primeros resultados del Proyecto Genoma Humano alrededor del año 2000, el estudio del genoma y su funcionalidad no ha parado de crecer. Esto ha permitido que, en la actualidad ya hayamos identificado algunas de las regiones exactas del ADN que explican las diferencias fenotípicas presentes entre los individuos, como pueden ser la predisposición a enfermedades o la respuesta a medicamentos. Y no solo eso, sino que, a partir del material genético obtenido de un individuo, ya somos capaces de identificar estas posiciones exactas en su genoma, lo cual nos aporta información útil y relevante desde el punto de vista clínico.

Cuando la información obtenida a partir del genoma de un individuo afecta a la respuesta de los medicamentos, nos referimos a ella como información farmacogenética y nos permite predecir, en un momento previo al inicio de los tratamientos, la respuesta que el paciente va a tener a un fármaco determinado. De esta manera podremos proporcionar información útil para el médico, que le ayude a orientar su estrategia terapéutica en base a información objetiva, como es la que se desprende de la interpretación del genoma del paciente.

De esta manera, con la utilización de la información farmacogenética en el ámbito clínico, lo que estamos consiguiendo es el desarrollo de una medicina personalizada, donde el paciente ocupa el centro del proceso asistencial.

La evolución de la práctica clínica hacia una medicina más personalizada es cada vez más una realidad. De hecho, durante los últimos años, incluso las autoridades políticas a nivel europeo se han hecho eco de esta necesidad y se han dedicado fondos comunitarios para financiar exclusivamente proyectos orientados a la implementación de la medicina personalizada. En este sentido, desde el año 2015 se lleva a cabo en 7 países de la Unión Europea el

proyecto *Ubiquitous Pharmacogenomics* (U-PGx; GA nº 668353), cuya finalidad es la implementación de las pruebas farmacogenéticas en la práctica habitual de los sistemas sanitarios europeos de tal modo que sean accesibles a cualquier ciudadano europeo.

Por otro lado, la enfermedad cardiovascular es, en la actualidad, la principal causa de muerte en el mundo occidental, siendo la responsable de aproximadamente el 50 % de los fallecimientos. Esta patología agrupa todas las enfermedades que afectan al sistema cardiovascular, aunque, dependiendo del órgano que se vea involucrado, diferenciamos entre enfermedad cardíaca y enfermedad vascular.

A su vez, la enfermedad vascular puede afectar a los vasos sanguíneos que irrigan el corazón y por tanto garantizan su funcionalidad (vasos coronarios), a la cual nos referimos como enfermedad coronaria; o, puede afectar a los vasos sanguíneos encargados de distribuir la sangre a todo el organismo, siendo esta la enfermedad vascular periférica (EVP), la cual incluirá un subgrupo de enorme importancia clínica y que por esta razón se trata independientemente de la enfermedad vascular periférica: las enfermedades cerebrovasculares. Así, cuando nos referimos a la EVP, ya sea arterial o venosa, nos referimos exclusivamente a la patología relacionada con la distribución de la sangre en las extremidades, reservando el término “enfermedad cerebrovascular” (ECV) a los problemas de salud derivados de los vasos sanguíneos encargados de distribuir la sangre desde el corazón al cerebro.

La enfermedad vascular se divide en 2 grandes ramas; la enfermedad arterial o enfermedad venosa, dependiendo de qué vasos están afectados, y a su vez en oclusiones crónicas o agudas en función de la etiología de éstas y el tiempo que tardan en desarrollarse.

Las oclusiones arteriales agudas son la interrupción brusca de la

circulación de una arteria que provoca la isquemia de un territorio distal a la oclusión; las causas pueden ser desde embolígenas, aneurismáticas o trombóticas (por la oclusión del vaso en el lugar del crecimiento de la placa de ateroma).

Las oclusiones crónicas son aquellas en las que se produce un cuadro isquémico progresivamente provocando una variada sintomatología, sus causas son fundamentalmente la aterosclerosis, la angiopatía diabética y la tromboangeítis obliterante.

De cualquier modo, la importancia de la enfermedad cardiovascular en general, y de la EVP y ECV en particular, es evidente desde el punto de vista epidemiológico. Esto ha supuesto, desde la aparición de la industria farmacéutica, un incremento constante del arsenal terapéutico orientados a la prevención y tratamiento de los eventos derivados de estas patologías, lo cual ha aumentado de forma considerable las posibles estrategias terapéuticas a adoptar por los facultativos a la hora de tratar a sus pacientes.

Paralelamente, a lo largo de los últimos años, la información farmacogenética relacionada con la respuesta variable que los pacientes presentan ante las diferentes terapias farmacológicas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares también se ha visto afectado por un crecimiento exponencial.

Ante este enorme arsenal terapéutico y volumen de información farmacogenética relacionada, cada vez es más necesario conocer la aplicabilidad y utilidad de las pruebas farmacogenéticas en la práctica clínica a fin de servir de herramienta útil a la hora de orientar al médico en su decisión al prescribir uno u otro medicamento.

1. ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA

La enfermedad arterial periférica (EAP) es, de entre todas las enfermedades cardiovasculares, la que afecta a las arterias no coronarias; o lo que es lo mismo, la enfermedad que afecta a los vasos encargados de la distribución distal, respecto al corazón, de la sangre en el organismo (1).

Se caracteriza por la presencia de una estenosis y/u oclusión arterial responsable de un insuficiente aporte de sangre, y por tanto de oxígeno a las extremidades, provocando un dolor agudo (isquemia). Cuando la descompensación entre el aporte de sangre y las necesidades del tejido se producen de forma brusca nos referimos a una isquemia aguda, mientras que la presencia de una estenosis que se desarrolla hasta ocluir el vaso es una insuficiencia arterial o isquemia crónica; esta permite, al desarrollarse a lo largo de la vida, la aparición de circulación colateral que compense la disminución de aporte de sangre al tejido irrigado por el vaso estenosado.

Desde el punto de vista fisiopatológico la isquemia puede ser funcional, cuando no ocurre en reposo, sino que necesita de actividad física para manifestarse en forma de claudicación intermitente (Ci); o crítica, si aparece en forma de dolor en reposo y/o de lesiones tróficas. La Ci es la forma de presentación clínica más habitual, pudiendo evolucionar a una isquemia crítica que implica la necesidad de tratamiento revascularizador precoz por riesgo de pérdida del miembro afectado (2); la EAP es una enfermedad con mal pronóstico a largo plazo, su diagnóstico implica un aumento de 15 veces el riesgo de muerte en 10 años respecto a pacientes sin la enfermedad (3).

La EAP afecta a un 15-20 % de los individuos mayores de 70 años (4, 5), y a igualdad de edad ha demostrado un aumento del 2% en la incidencia de muerte cardiovascular (CV).

Esta enfermedad, como hemos dicho, fundamenta su etiología en su desarrollo a lo largo de la vida, por lo que, aunque no al mismo tiempo, es

una enfermedad que suele presentar una afectación multisistémica, así, la mitad de los pacientes diagnosticados de EAP presenta síntomas de ECV y/o cardiológica (6), mientras que sólo un 13% presenta EAP aislada (7), además, la cardiopatía isquémica representa la causa de muerte del 50% de los pacientes diagnosticados de EAP. Por otro lado, el 30% de los pacientes diagnosticados de enfermedad coronaria presentan EAP, y entre estos la mortalidad es 2.5 veces mayor (6), además, en pacientes con enfermedad coronaria, la presencia de EAP eleva un 25% el riesgo de muerte CV.

A pesar de esta relación que parece existir entre la EAP y la enfermedad coronaria y aunque el 24% de los pacientes (7) presenta simultáneamente ECV, coronaria y EAP, cuando estudiamos la aparición de eventos isquémicos en los diferentes territorios la asociación entre EAP e isquemia cerebrovascular no es tan prevalente como con la enfermedad coronaria y sólo el 5% de los pacientes con EAP presentan un evento neurológico.

1.1 FACTORES DE RIESGO

Como acabamos de ver, el nivel de severidad de la EAP depende del tiempo de evolución de la enfermedad (aguda o crónica) y de su extensión (número de territorios afectados y coexistencia con enfermedad coronaria o cerebrovascular) (2).

Es una enfermedad más prevalente en hombres que en mujeres, aumentándose las diferencias cuanto mayor es el grado de afectación y disminuyéndose en grupos de edad muy avanzada. La edad es el marcador de riesgo más importante, duplicándose la prevalencia de la enfermedad entre los 60-65 años y los 70-75.

Además, como en el resto de enfermedades CV, la EAP se ve afectada por la presencia de los 5 principales factores de riesgo cardiovascular: Diabetes, hipertensión, tabaquismo, obesidad e hiperlipemia (8). Respecto el estatus de fumador, los fumadores tienen un mayor riesgo de sufrir la enfermedad,

tasa de amputación y mortalidad que los no fumadores, además los fumadores más severos presentan las formas más graves de la enfermedad (9), por otro lado, el abandono del tabaco está asociado con una disminución del riesgo de padecer EAP (10); si comparamos pacientes fumadores, ex-fumadores y no fumadores observamos que el ex-fumador tiene 7 veces más riesgo de sufrir EAP que un no fumador, y el fumador activo, 16 veces más (11).

La diabetes aumenta 10 veces el riesgo de amputación y por cada aumento de un 1% de hemoglobina glicosilada se produce una subida del 25% del riesgo de padecer EAP (12).

Entre hipertensos el riesgo de sufrir EAP es el doble que respecto a controles.

Como es lógico en cualquier enfermedad cardiovascular, la elevación del colesterol total y el colesterol LDL (*“low density lipoprotein”, cLDL*) se asocian con una mayor mortalidad; y el cociente colesterol total/cHDL (*“high density lipoprotein”, cHDL*) es el mejor predictor de EAP. Además, se ha comprobado que el tratamiento farmacológico de la hiperlipidemia reduce la progresión de la EAP (13).

1.2 DIAGNÓSTICO

La EAP es una enfermedad progresiva que se desarrolla a lo largo de la vida y suele diagnosticarse entrados en el último tercio de la vida del individuo, así, el diagnóstico precoz y el comienzo de un tratamiento adecuado desde el momento del diagnóstico son factores importantes a fin de garantizar una buena calidad de vida al paciente durante el mayor tiempo posible, y evitar el riesgo de eventos cardiovasculares mayores como ictus e infarto agudo de miocardio (IAM). En primer lugar, para el diagnóstico de esta enfermedad se realiza una evaluación clínica y exploratoria, comprobando la presencia de pulsos en los diferentes territorios del miembro con dolor,

además, signos como la temperatura del miembro, palidez o cianosis de la piel pueden hacer sospechar de la presencia de EAP, así, ante esta sospecha, se realizará una exploración vascular no invasiva.

La prueba diagnóstica no invasiva más habitual es el Índice tobillo-brazo (ITB), esta prueba, además, tiene un valor pronóstico durante el seguimiento del paciente. El ITB es el cociente entre la presión arterial sistólica maleolar y la presión arterial sistólica en el brazo, así, un valor cercano a 1 indicará la ausencia de enfermedad, valores entre 0.5 y 1, la presencia de EAP leve, y valores por debajo de 0.5 EAP, enfermedad grave o severa. Estos pacientes, con un ITB <0.5 , tienen el doble de riesgo de ser sometidos a una cirugía de revascularización o amputación y 2.5 veces más riesgo de isquemia crítica que aquellos con un ITB >0.5 ; además, se ha llegado a demostrar que por cada descenso de 0.1 en el ITB se produce un aumento del 10% en el riesgo de padecer un evento cardiovascular mayor (Ictus o IAM) (14).

Por contra, en pacientes con una calcificación arterial importante, pueden obtenerse valores anormalmente altos de presión en el tobillo debido a la falta de comprensibilidad de los vasos, dando lugar a falsos negativos para el diagnóstico de EAP mediante ITB; esta circunstancia se da en el 5-10% de los pacientes diabéticos. En estos pacientes con calcificación arterial, es especialmente útil para el diagnóstico el registro de la ondas de volumen de pulso ("*Pulse Volume Record*", PVR) mediante pletismografía (14).

A pesar de la fiabilidad del ITB y PVR en el diagnóstico de la EAP, hay pacientes que pueden presentar un cuadro de dolor agudo a media-larga distancia con valores de ITB y PVR normales y sin presentar ningún signo evidente de la enfermedad (cianosis, palidez etc.). En estos pacientes es útil la realización de una claudicometría, que consiste en la determinación del ITB al aparecer dolor tras andar una distancia. Así, una relación entre la disminución del ITB respecto al punto de partida (distancia= 0) y la aparición

de dolor será objeto de un diagnóstico positivo y precoz para EAP (7).

La sintomatología de estos pacientes se estratifica utilizando la clasificación de Leriche-Fontaine, que, siendo una herramienta con valor pronóstico, agrupa a los pacientes en 4 estadios.

ESTADÍO	SÍNTOMAS
I	Asintomático
II	Claudicación intermitente
IIa	Ci a > 150 m* * Ci no limitante en la actividad habitual del paciente
IIb	Ci a < 150 m* *Ci limitante en la actividad habitual del paciente
III	Dolor isquémico en reposo
IIIa	Presión sistólica en el tobillo > 50 mmHg
IIIb	Presión sistólica en el tobillo < 50 mmHg
IV	Lesiones tróficas
IVa	Úlcera
IVb	Gangrena

Tabla 1: Clasificación de Leriche-Fontaine (6)

El estadio I suele asociarse con un pronóstico favorable de la enfermedad, sobre todo, porque supone un diagnóstico precoz, sin haber presentado síntomas clínicos. La claudicación intermitente característica del estadio II puede confundirse con facilidad con dolores musculares de origen osteoarticular o neurológico debido al perfil tipo de los pacientes (pacientes pluripatológicos de avanzada edad), por esto, al evaluarse la presencia de claudicación intermitente, el dolor muscular debe darse para un mismo paciente siempre en los mismos territorios musculares y al recorrerse una distancia similar (a igualdad de pendiente y velocidad de marcha).

1.3 TRATAMIENTO

El tratamiento de la arteriopatía periférica, debido a su etiología y carácter progresivo a lo largo de la vida consiste en primer lugar en el cuidado y prevención respecto los factores de riesgo de la enfermedad, de hecho, en pacientes fumadores, abandonar el hábito tabáquico es el factor más eficaz en la prevención de la mortalidad cardiovascular (15); por otro lado, el ejercicio físico supervisado y una alimentación saludable han demostrado tener un efecto positivo sobre la calidad de vida de estos pacientes (16, 17).

El tratamiento farmacológico consistirá en la prevención de efectos secundarios cardiovasculares. En este sentido, las estatinas han demostrado una disminución del riesgo relativo (RR) de sufrir un evento CV mayor del 25% en pacientes con EAP respecto una población control sin apreciarse diferencias entre los pacientes en función del cLDL basal (18) y una mejora en la distancia de claudicación (19).

Los fármacos antihipertensivos, en especial los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) han demostrado una reducción del 25% de eventos CV mayores en pacientes con EAP, siendo eficaz incluso entre aquellos pacientes normotensos (20).

Los medicamentos antiagregantes plaquetarios (ATC:B01AC), en concreto el ácido acetilsalicílico (AAS) y clopidogrel demostraron una reducción en la combinada de muerte CV, IAM e Ictus del 23 y 23.8% respectivamente en pacientes con EAP, además, respecto el clopidogrel, esta reducción es 3 veces mayor si lo comparamos con el beneficio obtenido en pacientes con un diagnóstico diferente a EAP: 8.7% frente ese 23.8% (21, 22). En cambio, prasugrel y ticagrelor, los otros 2 antiagregantes plaquetarios disponibles para el tratamiento de la enfermedad coronaria no han demostrado su beneficio en pacientes con EAP (23, 24). Además, el uso combinado de

clopidogrel y AAS, que ha demostrado reducir todavía más esta combinada de muerte CV, IAM e ictus en pacientes con enfermedad coronaria, no ha conseguido contrastar esta eficacia en pacientes con EAP.

Por tanto, en pacientes con EAP, cuya única alternativa como tratamiento antiagregante son el AAS y clopidogrel, y ante la imposibilidad de usarlos de manera combinada, y sobre todo en aquellos pacientes con un estadio más avanzado de la enfermedad, ser capaces de predecir una respuesta variable a clopidogrel, puede suponer un aumento significativo en la reducción de la aparición de eventos CV mayores.

Para el tratamiento específico de la claudicación intermitente, además de las estatinas, han demostrado su eficacia con más o menos discordancia la pentoxifilina (25), y el cilostazol; mientras que la pentoxifilina parece ser útil únicamente las 12 primeras semanas de tratamiento (26), el cilostazol ha demostrado un aumento del 100% en la distancia de claudicación con un aumento de la distancia media igual a 140 m (27, 28), de este modo, aunque su uso no está indicado en la prevención de eventos isquémicos secundarios a enfermedad CV, si está indicado en el tratamiento de la claudicación intermitente.

La realización de un tratamiento quirúrgico dependerá de múltiples factores: territorio afectado, estadio de la enfermedad (*Ver tabla 1*), velocidad con la que se desarrolla, o técnica quirúrgica que precise el paciente; así, aquellos con EAP a partir de un estadio III de Fontaine, y por tanto con lesiones tróficas y riesgo de pérdida de la extremidad, tendrán indicada la cirugía, mientras que los pacientes en estado IIb o inferior dependerán del territorio afectado, morfología y extensión de la lesión, experiencia previa del cirujano y su equipo, predicción de la calidad de vida del paciente, variables clínicas como la edad, factores de riesgo cardiovasculares etc.

Como sea, los pacientes con EAP candidatos a ser sometidos a cirugía, ya sea endovascular o abierta, son los pacientes de peor pronóstico, para los cuales se ha descartado como alternativa eficaz cualquier otro tratamiento, ya sean medidas orientadas a fomentar hábitos de vida saludable, el control de los factores de riesgo CV o un tratamiento farmacológico por sí solo.

La eficacia en términos de permeabilidad de los diferentes procedimientos quirúrgicos en el tratamiento de la EAP depende de la zona intervenida y la técnica utilizada. En el territorio aortoiliaco (suprainguinal) la cirugía abierta proporciona una permeabilidad a 5 y 10 años del 85 y 80% respectivamente (6), mientras que en territorio infrainguinal (iliofemoral, poplíteo y distal) esta permeabilidad es del 65-80 % en 5 años. Por otro lado, la cirugía endovascular es más eficaz frente a lesiones cortas bien localizadas (29, 30), de lo que es frente lesiones largas y difusas en diferentes territorios. Además, estos valores de permeabilidad disminuyen en un 20% con el uso de prótesis y/o *stent*.

Los pacientes con EAP intervenidos quirúrgicamente, ya sea mediante una cirugía abierta o endovascular son tratados con terapia antiagregante preoperatoriamente y de manera indefinida; el uso de esta terapia antiagregante disminuye un 41% el riesgo de oclusión del vaso afectado en 12 meses (31, 32).

En definitiva, entre todos los pacientes con EAP, aquellos intervenidos quirúrgicamente, y por tanto con peor pronóstico, y que se les ha implantado prótesis/*stent*, son los que en potencia obtendrán un mayor beneficio de una terapia antiagregante; y de entre los 2 dos fármacos antiagregantes indicados en el tratamiento de esta enfermedad, clopidogrel ha demostrado ser el más eficaz, además de demostrar el mayor beneficio en la prevención de eventos CV mayores para esta indicación, así, predecir su respuesta en estos pacientes, podría suponer un avance relevante en la práctica clínica habitual.

2. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La ECV o ictus es un trastorno caracterizado por la alteración en la función de una o varias zonas del encéfalo de manera definitiva o transitoria debido a un aporte irregular de sangre por parte de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro (33).

La ECV es la segunda causa de muerte en el mundo occidental y la primera causa de discapacidad, y de entre el total de diagnósticos, el 85% se refieren a ECV isquémica.

Podemos diferenciar dos tipos de ECV, la isquémica, caracterizada por un aporte deficiente de sangre, o hemorrágica, en la cual la rotura de un vaso encefálico provoca una extravasación de sangre fuera del lecho vascular (33).

Si el evento isquémico genera un déficit neurológico recuperable en menos de 24h se denomina accidente isquémico transitorio (AIT), en cambio si se produce una lesión definitiva en la parénquima cerebral nos estaremos refiriendo a un infarto cerebral o ictus; ambos están íntimamente relacionados ya que entre el 15 y 30% de los infartos cerebrales vienen precedidos de un AIT (34), además, el 17% de los pacientes lo sufren ese mismo día y el 43% durante la semana previa (35).

El ictus puede ser aterotrombótico, debido a una aterosclerosis en los grandes vasos que irrigan el cerebro; cardioembólico cuando existe la presencia de una cardiopatía embolígena; lacunar, si la isquemia se produce en arteria o arteriolas perforantes cerebrales, con un diámetro habitualmente inferior a 200 μm ; o de causa indeterminada.

2.1 FACTORES DE RIESGO

Como en la enfermedad coronaria y periférica, la hipercolesterolemia es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la ECV, el colesterol total (36, 37) y la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (38, 39)

en suero han sido asociadas con un aumento del riesgo CV, además, los niveles de cLDL en jóvenes es un factor predictor de la aparición de la enfermedad en adultos (40), mientras, la reducción de los niveles de cLDL ha demostrado una disminución de la tasa de eventos cerebrovasculares y muerte (41). Por otro lado, una concentración alta de lipoproteínas de alta densidad (HDL) se asoció con una menor probabilidad de sufrir un evento cerebrovascular (38, 42), disminuyendo el riesgo de enfermedad coronaria un 2% en hombres y un 3% en mujeres (43).

La hipertensión también aumenta el riesgo de ECV (44). En individuos de 40 a 70 años se relacionó cada aumento de 10 mm/Hg en la presión arterial diastólica, o 20 mm/Hg en la sistólica, con el doble de riesgo de sufrir una ECV (45). Así, el tratamiento hipertensivo se relaciona con una reducción del riesgo de padecer un ictus de un 40% (46).

El hábito tabáquico está de igual manera relacionado con un aumento del riesgo de IAM y muerte súbita (47), este riesgo está relacionado con el número de cigarrillos fumados al día.

La diabetes incrementa 3 veces la probabilidad de sufrir ECV (48), además, el aumento de la hipertrigliceridemia y disminución de niveles de cHDL concomitantes a la diabetes, están relacionados con la aparición de ECV (49).

Teniendo en cuenta estos factores es lógico que un estilo de vida poco saludable (50), y la obesidad (51), también hayan sido asociados de forma significativa con la ECV.

2.2 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico concreto de la ECV y su identificación precoz son fundamentales para conseguir la mejor recuperación del paciente, este se basa en el estudio de la historia clínica del paciente y una exploración general

de este (signos de daño neurológico), un electrocardiograma (ECG), radiografía de tórax y pruebas específicas como la tomografía computarizada craneal (TC craneal), el estudio *doppler* de troncos supra-aórticos (DTSA) y transcraneal (DTC).

2.3 TRATAMIENTO

Teniendo en cuenta factores de riesgo de acabamos de comentar, la primera línea de tratamiento frente la ECV estará dirigida al control y la prevención de la enfermedad. En este sentido, y al igual que en la enfermedad coronaria, una dieta y estilo de vida saludables son fundamentales.

Respecto al tratamiento farmacológico de estos factores de riesgo, el uso de IECA (52, 53) y antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARAII) (54, 55) demostraron una disminución de la incidencia de eventos cerebrovasculares en prevención primaria y secundaria en pacientes de riesgo vascular. El tratamiento con estatinas también muestra una reducción significativa del riesgo de ictus en pacientes con una cardiopatía isquémica (56-58) y en pacientes con ictus previo (59).

Los antiagregantes plaquetarios son los fármacos más utilizados en la prevención secundaria de la ECV. Al igual que en el tratamiento de la EAP y a diferencia de la enfermedad coronaria, los nuevos antiagregantes (Prasugrel y Ticagrelor) todavía no tienen la indicación de uso en ECV (23, 24).

El AAS previene reduciendo el riesgo relativo de la combinada de ictus/AIT, IAM y muerte CV en un 25% y un 23% en pacientes con ictus previo (22), y actualmente es el tratamiento antiagregante de primera elección frente la ECV; el clopidogrel está indicado en el tratamiento de pacientes con elevado riesgo vascular o intolerancia a AAS y ha demostrado una reducción del riesgo relativo (RRR) de esta combinada frente AAS del 8.7% (21, 60). Otros antiagregantes plaquetarios como el triflusal, la ticlopidina y el

dipiridamol, aunque en menor medida, también son utilizados en ECV. En cualquier caso, el tratamiento antiagregante en las primeras 48h desde el diagnóstico de la ECV reduce la mortalidad y recurrencia de la enfermedad (61, 62).

Como tratamiento preventivo de elección de la ECV de origen cardioembólico se utilizan los anticoagulantes orales, ya que han mostrado una RRR del 8-48% de ictus recurrente respecto AAS en pacientes con fibrilación auricular (FA) (63, 64).

ESTRATEGIA TERAPÉUTICA	NNT
Tratamiento farmacológico *	
<i>*Comparado con AAS</i>	
AAS 50 mg + dipiridamol 400 mg/día frente a AAS 50 mg/día	33 para evitar un ictus en 2 años
Ticlopidina 500 mg/día frente a AAS 1.300 mg/día	40 para evitar un ictus en 2 años
Clopidogrel 75 mg/día frente a AAS 325 mg/día	125 para evitar un ictus en 2 años
TEA carotídea + tratamiento médico: pacientes sintomáticos*	
<i>*Comparado con tratamiento farmacológico</i>	
Estenosis carotídea del 70 al 99%	8 para evitar un ictus en 2 años
Estenosis carotídea del 50 al 69%	20 para evitar un ictus en 2 años
Estenosis carotídea < 50%	67 para evitar un ictus en 2 años
TEA carotídea + tratamiento médico: pacientes asintomáticos*	
<i>*Comparado con tratamiento farmacológico</i>	
Estenosis carotídea ≥ 50%	48 para evitar un ictus en 2 años
Estenosis carotídea ≥ 60%	83 para evitar un ictus en 2 años

NNT: Número Necesario de Tratar; AAS: Ácido Acetil Salicílico; TEA: Tromboendarterectomía

Tabla 2: Estrategia terapéutica en ECV (Modificado de (33))

En el tratamiento en fase aguda de la ECV, la utilización de una terapia trombolítica intravenosa con plasminógeno recombinante durante las 3 h siguientes al establecimiento del evento cerebrovascular, aumentó un 11-13% el número absoluto de pacientes con una evolución categorizada como “excelente”, aunque con un aumento del 6.4% del riesgo de padecer una hemorragia cerebral sintomática (65). El uso de una terapia trombolítica intra-arterial con urokinasa en las 6 primeras horas desde el evento cerebrovascular también ha demostrado beneficio (66).

El tratamiento quirúrgico de la ECV, consistente en una tromboendarterectomía (TEA) está indicado en pacientes con estenosis carotideas del 60-70% o superior en función de la fuente (67, 68).

A diferencia de la EAP, la realización de una angioplastia a nivel carotideo ha mostrado resultados variables respecto su éxito (67-69), aunque lo que sí parece claro, es que el implante de *stent*, al igual que en la enfermedad coronaria y periférica, descende la morbimortalidad de la ECV (70).

Respecto al tratamiento quirúrgico frente a estenosis carotideas asintomáticas, aunque la realización de una TEA demostró mejores resultados que el tratamiento farmacológico en pacientes con estenosis superiores al 70% (71, 72), este éxito quirúrgico precisa que el equipo quirúrgico tenga una morbimortalidad inferior al 3% y realizar 85 TEA para prevenir finalmente un ictus en 2 años de evolución (33).

3. CLOPIDOGREL

El clopidogrel es un profármaco antitrombótico, que actúa como inhibidor de la agregación plaquetaria, se absorbe a nivel intestinal (73), y debe ser metabolizado a nivel hepático por el sistema enzimático citocromo P450 (CYP), principalmente por las isoformas CYP1A2, CYP2B6 y CYP2C19 (74), para así obtener el 2-oxo-clopidogrel, que es el precursor inmediato de su metabolito activo. Este segundo metabolismo, de 2-oxo-clopidogrel a la forma activa, parece estar mediado por la isoenzima CYP3A4 (75, 76). Aunque el papel exacto de cada una de las isoenzimas CYP en cada uno de los 2 pasos que conforman la activación de clopidogrel no está claro, se concluyó (74) que la CYP2C19 actúa en ambos pasos metabólicos y la isoenzima CYP3A4 únicamente en el segundo. Como sea, el metabolito activo producto de este metabolismo actúa inhibiendo selectiva e irreversiblemente la unión del adenosín-fosfato (ADP) a su receptor plaquetario (P2Y₁₂), y, por tanto, inhibe también la activación mediada por ADP del complejo IIB-IIIa de la glicoproteína plaquetaria (complejo GPIIb-IIIa).

El clopidogrel se administra diariamente en una única dosis de 75 mg que consigue una inhibición de la agregación plaquetaria desde el primer día y aumenta hasta alcanzar el estado estacionario entre los días 3 y 7 desde la primera toma; por esto, si es necesario, se puede administrar una dosis de carga de 300 mg que ayude a alcanzar este estado estacionario más rápidamente (78).

El uso de clopidogrel está indicado según ficha técnica para la prevención de eventos aterotrombóticos en pacientes adultos que presentan un síndrome coronario agudo (SCA) con elevación (SCACEST) y sin elevación del segmento ST (SCASEST), en pacientes que han sufrido recientemente un IAM o ictus, en pacientes con EAP establecida (79), y en la prevención de eventos aterotrombóticos y tromboembólicos en pacientes con FA. Como el resto de

los fármacos antiagregantes, su uso está contraindicado en caso de insuficiencia hepática grave, hemorragia activa o hipersensibilidad al principio activo o a cualquiera de los excipientes.

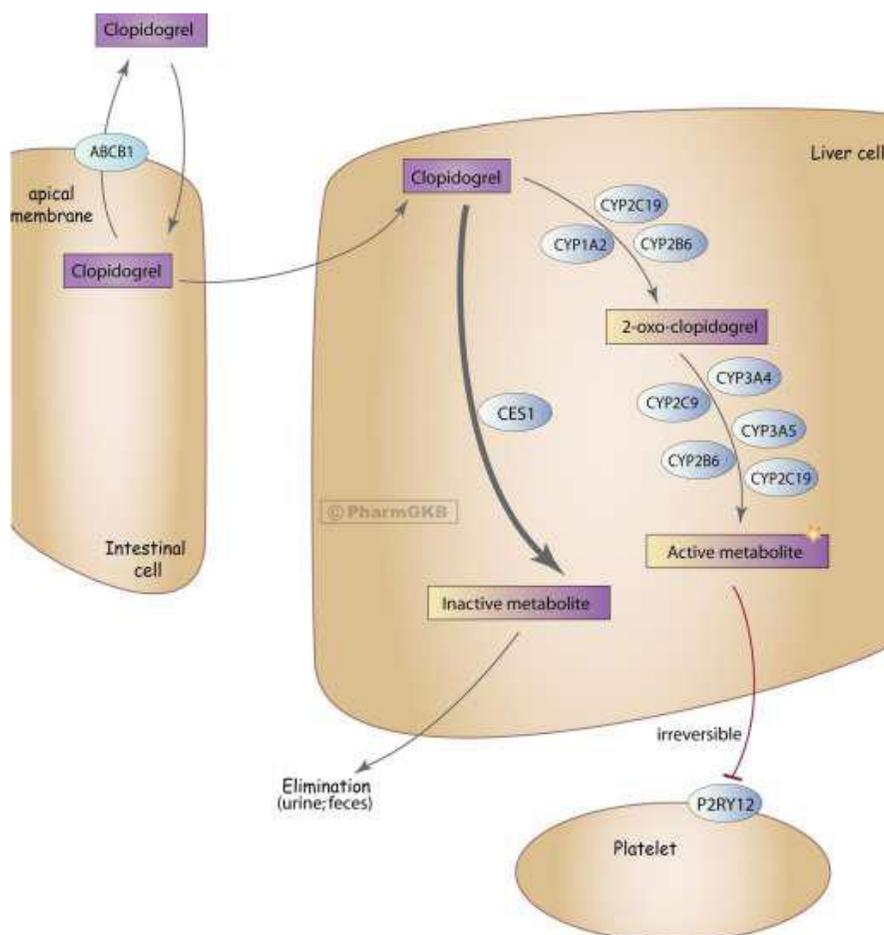


Ilustración 1: Metabolismo del clopidogrel (77)

En pacientes con SCA, ya sea con o sin elevación del segmento ST (SCASEST o SCACEST), se debe iniciar el tratamiento con una dosis de carga de 300 mg y continuar con 75 mg diarios, combinado con 100 mg de AAS, durante mínimo un mes y máximo un año; y aunque parece ser eficaz

continuando el tratamiento más allá de los 12 meses, el beneficio máximo en estos pacientes se ha observado en 3 meses de tratamiento. En casos de ECV o EAP establecida, se seguirá la misma pauta, aunque en este contexto todavía no se haya demostrado el beneficio de la doble terapia antiagregante en tratamientos superiores a 4 semanas. Así pues, estos pacientes, pasado el primer mes, son tratados con terapia antiagregante simple de AAS o clopidogrel.

La eficacia de clopidogrel en la prevención de eventos secundarios a SCASEST (angina inestable o infarto de miocardio sin onda Q) se estudió en el ensayo CURE (80), este, comparó el tratamiento con clopidogrel durante máximo 12 meses frente placebo, en 12.562 pacientes, todos tratados con AAS. Clopidogrel demostró, para la combinada de muerte CV, IAM o ictus una RRR del 20% (IC95%= 10-28%; $p=0.00009$) respecto placebo, además, esta RRR fue del 29% en pacientes sometidos a una angioplastia coronaria transluminal percutánea, ya fuese con o sin implante de *stent*. Por otro lado, para la covariable combinada de muerte CV, ictus, IAM o isquemia refractaria, la RRR en el grupo tratado con clopidogrel fue del 14% (IC95%= 6-21%; $p=0.0005$).

En pacientes con SCACEST los ensayos CLARITY (81) y COMMIT (82) demostraron la eficacia de clopidogrel frente a placebo. CLARITY estudió durante 1 mes de evolución la combinada de muerte CV, IAM recurrente antes de la angiografía coronaria, y oclusión de la arteria responsable del IAM en 3.491 pacientes que fueron tratados con clopidogrel o placebo y AAS durante 28 días o hasta el alta hospitalaria, obteniendo una RRR a favor del clopidogrel igual a 36% (IC95%= 24-47%; $p<0.001$), sobre todo relacionado con la reducción en la oclusión del vaso coronario responsable del IAM. El ensayo COMMIT, estudió en las mismas condiciones (duración del tratamiento, uso concomitante de AAS, tiempo de seguimiento) 45.852

pacientes, siendo la variable respuesta el exitus por cualquier causa, o la combinada de IAM, ictus o fallecimiento; aquí, clopidogrel demostró una RRR para la primera variable del 7% ($p=0.029$) y del 9% ($p= 0.002$) para la segunda.

Más concretamente, entre los pacientes diagnosticados de SCA, aquellos sometidos a una intervención coronaria percutánea (ICP) fueron los que mostraron un mayor beneficio obtenido con el tratamiento con clopidogrel. El estudio PCI-CURE (83) demostró una RRR del 30% de la combinada de muerte CV, IAM o revascularización urgente durante los 30 primeros días tras la ICP en pacientes tratados con clopidogrel y AAS, sin aumentar el riesgo de sangrado; y el estudio CREDO (84) corroboró estos resultados en pacientes sometidos a un tratamiento de larga duración (12 meses), obteniendo una RRR de muerte, IAM o ictus/AIT del 27%.

En pacientes con FA el estudio ACTIVE-W (85) demostró que el tratamiento anticoagulante con antivitamínicos K es más eficaz que con clopidogrel y AAS combinados; en cambio, el estudio ACTIVE-A (86), que comparó pacientes con FA y al menos un factor de riesgo vascular, tratados con clopidogrel + AAS, frente placebo + AAS, con un periodo de seguimiento de 5 años, demostró para la combinada de accidente cerebrovascular (ACV), IAM, embolia o muerte CV, una RRR del 11.1% ($IC_{95\%}= 2.4-19.1\%$; $p= 0.013$); esta RRR se debió sobre todo a la influencia de la variable ACV, que al ser comparada de manera independiente resultó en una RRR en el grupo tratado con clopidogrel igual a 28,4% ($IC_{95\%}= 16.8-38.3\%$; $p=0.00001$). Por tanto, en el tratamiento de la FA solo se podrá utilizar clopidogrel en combinación con AAS en pacientes con al menos un factor de riesgo vascular, índice de hemorragia bajo y tratamiento anticoagulante con antivitamínicos K (acenocumarol o warfarina) contraindicado.

De los 5 principales ensayos que evalúan la eficacia y seguridad del clopidogrel, CAPRIE (21) es el único que compara clopidogrel frente AAS en pacientes con EAP o ECV, y no sólo en pacientes con SCA. CAPRIE incluyó 19.185 pacientes en los que se estudió como variable respuesta principal, la combinada de ictus, IAM o muerte CV, y en los que el seguimiento duró entre 1 y 3 años. En el análisis por intención de tratar, clopidogrel demostró reducir significativamente la incidencia de la variable principal (RRR=8.7%; IC95%= 0.2-16.4%; $p= 0.045$), suponiendo una reducción cada dos años de 10 eventos por cada 10.000 habitantes. Al analizar por subgrupos, en función del diagnóstico por el que se reclutaron a los pacientes, aquellos con EAP fueron los que mostraron un mayor beneficio por parte de clopidogrel (RRR= 23.7%; IC95%= 8.9-36.2%; $p=0.003$); en cambio, entre los pacientes con ECV, el beneficio fue menor (RRR= 7.3%; IC95%= -5.7-18.7%; $p=0.258$).

Los estudios MATCHL (87) y CHARISMA (88), que analizaban la eficacia y seguridad del tratamiento con clopidogrel y AAS combinados, en pacientes con ECV de alto riesgo isquémico, no demostraron beneficio y si un mayor riesgo de hemorragias.

En definitiva, clopidogrel ha demostrado su eficacia en SCA, EAP y ECV. Frente a AAS, ha demostrado ser más eficaz en pacientes con EAP que en pacientes tras un SCA, en cambio, en pacientes con ECV su eficacia fue menor. Todo esto siempre en estudios con seguimientos menores a 12 meses, aunque la aparición de eventos CV importantes, respecto frecuencia y distribución temporal, varía significativamente entre estas 3 patologías.

4. FARMACOGENÉTICA

El genoma es el conjunto de toda la información hereditaria de un organismo, contenida en una secuencia de nucleótidos de ácido desoxirribonucleico (ADN), que incluye la totalidad de los genes y otras secuencias de material genético no codificadoras y que se transmite de una generación a la siguiente (89).

El ADN humano puede ser mitocondrial, que tiene una estructura circular y se hereda únicamente de la madre, y nuclear, formado por 22 parejas de autosomas y una pareja de cromosomas sexuales (XX en mujeres, XY en hombres), organizado en una cadena diploide con estructura de doble hélice, en la que uno de los complementos cromosómicos es de origen materno, y el otro, paterno.

El “Proyecto Genoma Humano”, finalizado en el año 2003 (90) demostró que los seres humanos nos diferenciamos en solo el 0.1% de nuestro genoma, compuesto en su totalidad por aproximadamente 3.000 millones de pares de bases (pb), así, en este 0.1% está contenida toda la información genética relativa a las diferencias entre los individuos, desde el color del pelo, la predisposición a sufrir una enfermedad o a responder de manera diferente a un tratamiento. Existen 2 disciplinas que tratan de explicar las diferencias interindividuales en la respuesta a los fármacos, la farmacogenética y la farmacogenómica; la ICH (*Conference of Harmonisation*) las define como:

- Farmacogenética: *El estudio de las variaciones en la secuencia de ADN relacionadas con la respuesta a los medicamentos* (91); entendiendo como “medicamento”: cualquier producto medicinal, medicamento en investigación, medicamento o producto farmacéutico (incluyendo vacunas y otros productos biológicos); y “respuesta a medicamento” como: procesos de absorción y distribución del medicamento y los efectos de este (eficacia, efectos

adversos, farmacodinámica).

- Farmacogenómica: el estudio de las variaciones de las características del ácido ribonucleico (ARN) y ADN relacionadas con la respuesta a los fármacos (91) y la enfermedad.

La principal diferencia entre estas 2 disciplinas se encuentra en que la farmacogenética se basa en que a partir del genotipo de un individuo podemos explicar su respuesta a un medicamento, mientras, la farmacogenómica estudia, en un sentido más amplio, como los genes responsables de una respuesta variable a un medicamento manifiestan sus variaciones para configurar el fenotipo del paciente.

De cualquier modo, ambas estudian las diferencias entre individuos en la respuesta a los medicamentos observadas en las poblaciones (92), y en la actualidad utilizamos estos términos indistintamente.

Cada uno de los lugares del genoma que muestran una variación, ya sea un sólo nucleótido o un fragmento más largo, es lo que denominamos marcador genético. Las diferentes variantes en la secuencia de nucleótidos para cada marcador genético se denomina alelo, el más común en una población de individuos es el alelo salvaje/silvestre (*wild type*), y el/los menos comunes, alelo mutante. Cuando un alelo mutante está presente en más de un 1% de la población nos estamos refiriendo a un polimorfismo genético.

El genotipo es la combinación de alelos que porta un individuo para un determinado marcador genético en función de la herencia recibida, por tanto, en función del genotipo, podemos clasificar a los individuos en heterocigotos, cuando portan dos alelos diferentes, y homocigotos, cuando son iguales. El fenotipo se refiere a las características observables en un individuo determinadas por su genotipo.

Las variaciones en el genoma entre los diferentes individuos pueden consistir en inversiones (cambios de sentido) de la secuencia de nucleótidos, deleciones/inserciones o sustituciones nucleotídicas (transiciones y transversiones).

Se considera, que los diferentes polimorfismos genéticos explican entre el 15-30% de la variabilidad en la respuesta a los medicamentos (93). Entre todos ellos, los “*Single Nucleotid Polymorphisms*” (SNP), o polimorfismos de un único nucleótido, consistentes en la sustitución puntual de una base nitrogenada por otra, destacan por ser la mayor fuente de variación en el genoma humano, pues suponen el 90% de las variaciones encontradas en el ADN, y han demostrado ser los marcadores genéticos de referencia en genética humana (94, 95).

Los SNPs se dividen en (96):

- cSNP: SNPs en la región codificadora. Se subdividen en:
 1. No sinónimos: o mutación de aminoácido, el cambio del par de bases provoca la sustitución del aminoácido, lo que puede modificar la estructura y estabilidad de la proteína, su afinidad al sustrato, o introducir un codón de terminación.
 2. Sinónimo: o codificador, cuando la sustitución del par de bases dentro de un codón no modifica el aminoácido codificado.
- SNPs en regiones NO codificadoras. Tienen consecuencias funcionales, y son muy utilizados con fines de individualización, por lo que se están incluyendo en baterías de marcadores, sobre todo en estudios forenses.

En el año 2013 ya había 40 millones de SNP identificados en humanos y actualmente se ha conseguido asociar de manera significativa la presencia de algunos de ellos a la respuesta variable de medicamentos. Se estima, que

esta respuesta variable a los medicamentos ocurre en uno de cada 3 individuos.

Cada individuo, hereda de sus progenitores 2 alelos de un mismo gen, estos, pueden ser el alelo salvaje (*wild type*) o un alelo con una variante o “mutado”, lo cual determinará su genotipo (homocigoto dominante, recesivo o heterocigoto). En función de la combinación de alelos que porte el individuo (genotipo) podremos clasificarlo fenotípicamente.

Así, un individuo portador de 2 alelos *wild type* (homocigoto dominante) se considera fenotípicamente “normal”. Cuando el gen al que nos referimos codifica la expresión de una enzima metabólica, habitualmente nos referimos a este fenotipo como “*extensive metabolizers*” (EM). En cambio, un individuo portador de dos alelos “mutados” (heterocigoto recesivo) que resulte en una enzima con menor actividad se denominará “*poor metabolizer*” (PM). Por el contrario, si el enzima resultante presenta una mayor actividad que la normal se llamará “*ultrarrapid metabolizer*” (UM). Los individuos heterocigotos pueden clasificarse en EM, PM, UM o “*intermediate metabolizers*” (IM), esto se debe, a que el genotipo no es la única variable que determina el fenotipo. Puede ocurrir, que uno de los 2 alelos expresados en un individuo heterocigoto tenga menos peso que el otro en el balance global de la actividad de la molécula que expresan.

De cualquier modo, la presencia de determinados SNP en el genoma de un individuo provoca un cambio en la pauta de lectura y/o expresión del aminoácido que codifica, de tal modo que si la proteína expresada (habitualmente una enzima) está relacionada con la actividad de un fármaco, ésta se puede ver afectada mediante un aumento/disminución/anulación de su función o mediante el variaciones de su concentración; provocando un cambio de la absorción, distribución, metabolismo o eliminación del fármaco relacionado, o un cambio en su mecanismo de acción.

5. CITOCROMO P-450

Los citocromos, del griego *bitos* («hueco», – en biología, «célula» –) y *roma* («color»), son pigmentos localizados en las células hepáticas, identificados durante los años 50. Klingenberg (97) y más tarde Omura y Sato (98), identificaron como uno de estos pigmentos unido a una molécula de monóxido de carbono presentaba su pico de absorbancia en el espectro ultravioleta (UV) a 450nm de longitud de onda, a este se le denominó citocromo P-450 (P, por pigmento y 450 por su pico de absorbancia).

El citocromo P-450 (CYP) es un pigmento hemoproteico, ampliamente distribuido en la naturaleza, desde plantas, a animales o protistas. En concreto, en el ser humano, esta distribución es igual de heterogénea, y encontramos CYP en células de todo el organismo, aunque es particularmente significativa su presencia a nivel hepático (99). A nivel celular, se encuentran anclados a casi cualquier membrana subcelular, especialmente en la mitocondria y retículo endoplasmático (100, 101).

Actualmente han sido identificadas más de 7.700 isoenzimas del CYP (2.740 en animales) distribuidas en 74 familias (43 humanas) y 866 subfamilias (102), debido a esta variedad, en el año 1987 se determinó un sistema de nomenclatura y clasificación que obedece a criterios filogenéticos y nombra cada CYP450 en función de la secuencia de aminoácidos que conforman las cadenas polipeptídicas de cada isoenzima (103).

Así, dos CYP pertenecen a la misma familia cuando coinciden en más del 40% en su secuencia de aminoácidos y si esta coincidencia es superior al 55% pertenecen a la misma subfamilia. Dentro de una misma subfamilia, los CYP se considerarán diferentes siempre y cuando su cadena de aminoácidos difiera en más de un 3%, y estos se nombran otorgándoles a cada uno un número comenzando desde el 1.

Las diferentes isoenzimas CYP presentan una amplísima variabilidad

funcional, siendo capaces de catalizar gran cantidad de procesos uniéndose a multitud de sustratos (102).

En lo que se refiere a los medicamentos, las diferentes isoenzimas CYP pueden participar en su metabolismo catalizando reacciones en Fase 1, encaminadas a aumentar el número de grupos polares de la molécula (reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis), incrementando su solubilidad, y por tanto, facilitando su excreción; y reacciones de Fase II, las cuales, utilizando como sustrato tanto el medicamento, como metabolitos producto de las reacciones de Fase I, catalizan reacciones de conjugación del sustrato con moléculas endógenas, facilitando su transporte y excreción. Cuando afectan a un profármaco, estas reacciones catalizadas por el CYP pueden dar lugar al metabolito activo responsable del efecto terapéutico del fármaco.

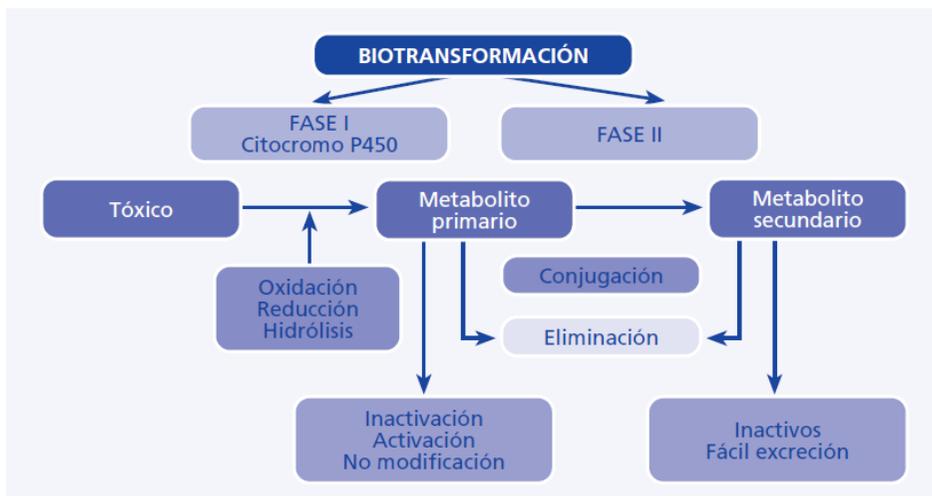


Figura 1: Reacciones de biotransformación de fármacos (104)

Una variación en la secuencia de ADN de los genes que codifican la expresión de las diferentes isoenzimas del CYP, se traduce en una variabilidad en la actividad de estas isoenzimas, pudiendo aumentarla o disminuirla.

Así, en el caso de los medicamentos, si la variación en la secuencia de

ADN que codifica la expresión de la isoenzima CYP se relaciona con un aumento de la actividad de la enzima (fenotipo UM), esta enzima “polimórfica” metabolizará en mayor grado el fármaco, disminuyendo su biodisponibilidad, y, por tanto, pudiendo provocar una disminución en su eficacia. En cambio, si la variación en el ADN da lugar a una disminución en la actividad de la enzima (fenotipos IM o PM), el fármaco se metabolizará en menor grado del habitual, así, éste no se eliminará de la manera normal, pudiendo resultar en un acúmulo de fármaco en el organismo, y así, en toxicidad derivada del uso del medicamento.

En el caso de los profármacos ocurrirá lo contrario, de este modo, cuando una variación en la secuencia de ADN que expresa una isoenzima CYP que participa en la activación del profármaco da lugar a un aumento de su actividad metabólica (Fenotipo UM), se producirá más rápidamente el metabolito activo del profármaco, pudiendo aumentar su efecto y/o la aparición de reacciones adversas al medicamento. Mientras, un fenotipo IM o PM daría lugar a una menor conversión del profármaco en su metabolito activo, lo cual supondría una disminución de la eficacia del tratamiento.

5.1 CYP2C19

Como ya hemos comentado, los CYP tienen una distribución amplia y heterogénea en el organismo y están presentes en la mayoría de los tejidos. La mayoría de las reacciones de biotransformación de fármacos y profármacos las realizan las isoformas de las familias A, B o C, que suponen el 70% del contenido de CYP a nivel hepático en humanos. Entre estas, las isoenzimas de la subfamilia CYP2C suponen el 20% del total de los CYP en el hígado (104).

El CYP2C19, dentro de esta subfamilia, es el CYP de mayor relevancia clínica e interviene en la biotransformación de aproximadamente el 15% de todos los medicamentos metabolizados por el CYP (105).

NIVEL DE EVIDENCIA*	FÁRMACO	POLIMORFISMOS	RELACIÓN FÁRMACO-POLIMORFISMO
1A	Amitriptilina	CYP2C19*1, *2, *3, *17	Eficacia/Toxicidad
	Clopidogrel	CYP2C19*1, *2, *3, *4, *5, *6, *8, *17	Eficacia/Toxicidad
	Voriconazol	CYP2C19*1, *2, *3, *17	PK
	Sertralina	CYP2C19*1, *2, *3	PK
	Citalopram / Escitalopram	CYP2C19*1, *2, *3, *17	Eficacia/Toxicidad
2A	Imipramina	CYP2C19*1, *2, *3, *17	Eficacia
	clomipramina	CYP2C19*1, *2, *3, *17	Eficacia / Otro
	Citalopram / Escitalopram	CYP2C19*17	PK
	Lansoprazol	CYP2C19*1, *2, *3	Eficacia
		CYP2C19*17	Eficacia/PK
	Rabeprazol	CYP2C19*1, *2, *3	PK
	Omeprazol	CYP2C19*1, *2, *3	Eficacia
	Clobazam	CYP2C19*1, *2, *3	Eficacia/PK
2B	AAS	CYP2C19*1, *2, *17	Eficacia/Toxicidad/PK

*Se excluyeron las relaciones fármaco-polimorfismo con un nivel de evidencia 3 ó 4 (menor de 2); PK: farmacocinética

Tabla 3: Variantes CYP2C19 con influencia en la respuesta a fármacos (106)

El gen CYP2C19, que codifica la expresión de la enzima con el mismo nombre, se localiza en el cromosoma 10q23.33 y es altamente polimórfico, habiéndose identificado ya más de 25 variantes alélicas de este gen (107), de las cuales, 7 han demostrado, con un nivel de evidencia 1^a, estar asociados a la respuesta de 6 fármacos diferentes (Ver Tabla 3).

Los *CYP2C19**2, *3, *4, *5, *6 y *8, se asociaron con una pérdida de función de la enzima (“*loss of function*”, LOF), lo que se traduce en un fenotipo IM para los individuos heterocigotos, y PM para los homocigotos recesivos (108). Mientras, la presencia del alelo *CYP2C19**17 se asoció con un aumento de la función de la enzima (“*gain of function*”, GOF) y por tanto, con un fenotipo UM (109), aunque las guías de dosificación basadas en farmacogenética/farmacogenómica clasifican únicamente como UM a los individuos homocigotos recesivos (*CYP2C19**17/*17), y por tanto, consideran EM o metabolizadores normales a los individuos heterocigotos para esta posición (*CYP2C19**1/*17).

El alelo *CYP2C19**1 o “*wild type*” representa el fenotipo con actividad normal o EM del citocromo.

ALELO	VARIACIÓN NUCLEOTÍDICA	DB SNP RS	FRECUENCIA ALÉLICA
*2	681G>A	rs4244285	14(A)/86(G)
*3	636G>A	rs4986893	100(G)/0(A)
*4A/B	1A>G	rs28399504	99(A)/1(G)
*5	1297C>T	rs56337013	100(C)/0(T)
*6	395G>A	rs72552267	100(G)/0(A)
*8	358T>C	rs41291556	100(T)/0(C)
*9	431G>A	rs17884712	100(G)/0(A)
*10	680C>T	rs6413438	100(C)/0(T)
*17	-806C>T ³	rs12248560	78(C)/22(T)

Tabla 4: Polimorfismos *CYP2C19* con relevancia clínica

El SNP *CYP2C19**2 consiste en un cambio G>A (c.681G>A; rs4244285) en el exón 5 que da lugar a un sitio de “*splicing*” aberrante, de este modo, se altera la pauta de lectura del ARN mensajero (ARNm) transcrito, lo cual se traduce en una proteína no funcional (110).

El alelo *CYP2C19**2 (c.681G>A; rs4244285) es el más común en nuestra población entre todos los alelos *CYP2C19* con pérdida de función (*Ver tabla 4*), con una frecuencia aproximada del 15%, además, esta frecuencia aumenta en otras poblaciones, suponiendo hasta un 29-35% en asiáticos.

Por otro lado, el alelo *CYP2C19**17 consiste en una transición C>T (c.-806C>T; rs12248560) que provoca la aparición de un sitio de unión consenso por el cual la familia de factores de transcripción GATA muestra una gran afinidad, esto se traduce en un aumento de la expresión y actividad de la enzima *CYP2C19* (111-113).

El *CYP2C19**17 (c.-806C>T; rs12248560), con una frecuencia muy variable (del 3 al 21% dependiendo de la población) pero significativa (>3%), es en la actualidad el único asociado a un aumento de la actividad de la enzima con importancia desde el punto de vista farmacogenético.

Además, la evidencia actual indica que el aumento de actividad del enzima provocado por la presencia del *CYP2C19**17 no compensa el provocado por los alelos *CYP2C19**2-*8 o LOF (114), así, actualmente los individuos portadores de *CYP2C19**2 y *17 se clasifican fenotípicamente dando más peso a la presencia del primero.

Por tanto, aunque se ha demostrado la existencia de otros polimorfismos del gen *CYP2C19*, los *CYP2C19**2 y *17, son los únicos que han demostrado su influencia sobre la respuesta a algún medicamento y con una frecuencia suficiente como para incidir de manera significativa en la práctica clínica en nuestra población.

6. ABCB1

El adenosín trifosfato (ATP)-*binding cassette transporter* B1 (ABCB1), también llamada glicoproteína-P o "*multidrug resistance protein 1*" (MDR1) es una proteína transportadora perteneciente a la superfamilia de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC). Esta protege las células al actuar como una bomba de flujo o transporte unidireccional hacia el exterior de la célula para multitud de sustancias endógenas y xenobióticos, como son los medicamentos.

El ABCB1 tiene una distribución muy amplia en el organismo y se expresa en casi todas aquellas células de órganos que tienen una función de barrera o excreción, como pueden ser el hígado (membrana canalicular de los hepatocitos), riñón (membrana apical del túbulo renal), placenta o barrera hematoencefálica (en el endotelio) (115, 116), además, podemos localizar el transportador ABCB1 en células cancerígenas, hematopoyéticas y linfocitos, lo cual se ha relacionado con una influencia sobre la resistencia a fármacos en el tratamiento de la leucemia, otros tipos de cáncer (117) y VIH (118).

El gen *ABCB1*, que codifica la expresión de este transportador se encuentra en el cromosoma 7 (región 7q21.12), abarcando 251.3 Kb que se traducen en una proteína de 1280 aminoácidos de longitud.

El mecanismo concreto por el que actúa el transportador ABCB1 no se conoce con exactitud (119, 120) aunque si es evidente que muestra una gran afinidad por multitud de sustratos (121-123).

A pesar de que se han identificado más de 8.440 SNP en el gen *ABCB1*, la mayoría se encontraron mediante estudios de secuenciación masiva (124, 125), y entre todas estas variantes, solo unas pocas (*Ver tabla 5*) demostraron estar presentes en alguna población con una frecuencia mayor al 0.01%.

La presencia de algunas de estas variaciones genéticas se asoció con una

respuesta a variable a medicamentos, aunque por diversas razones estos resultados fueron contradichos en la mayoría de los casos.

VARIACIÓN NUCLEOTÍDICA	DBSNP RS ID	FRECUENCIA ALÉLICA EN CAUCÁSICOS
c.61A>G	rs9282564	8(G) / 92(A)
c.781A>G	rs36008564	0(G) / 100(A)
c.1199G>A/T	rs2229109	2.5(A/T) / 97.5(G)
c.1236C>T	rs1128503	45.9(T) / 54.1(C)
c.2005C>T	rs35023033	0(T) / 100(C)
c.2677G>T/A	rs2032582	46.4(T)-3.6 (A) / 53.6-96.4(G)
c.3241T>A	rs2229107	0(A) / 100(T)
c.3435C>T	rs1045642	56.1(T) / 43.9(C)
c.3751G>A	rs28364274	0(A) / 100(G)

Tabla 5: Polimorfismos en el gen *ABCB1* con frecuencia >0.01 en alguna población (126)

La variante *ABCB1 3435C>T* se encuentra en el exón 25 y consiste en un SNP sinónimo que se traduce en una isoleucina situada en el sitio de unión del ATP del transportador. La variante *1236C>T* consiste también en un SNP sinónimo y se traduce en una glicina. Mientras, la variante trialélica *2677G>T/A* provoca una sustitución de alanina por serina o treonina en la región intracelular del transportador.

Las frecuencias de estas 3 variantes han demostrado un desequilibrio por ligamiento. Debido a esta cercanía y teniendo en cuenta que las variantes *3435C>T* y *1236C>T* se traducen en el mismo aminoácido; se supone que cualquier impacto en el fenotipo o respuesta de un medicamento que puedan tener se debe al ligamiento con la variante *2677G>T/A* (126).

Aunque, por otro lado, se propuso que el SNP *3435C>T* podría actuar reduciendo la estabilidad del ARNm (127), o modificando la unión del transportador a la membrana celular provocando un cambio en la afinidad del sustrato (128).

En cualquier caso, sabemos que un aumento o disminución en la expresión del transportador puede resultar en una variación en la biodisponibilidad del fármaco en el organismo y, por tanto, afectar a la respuesta de un individuo al tratamiento.

Por otro lado, también sabemos que la expresión de este transportador varía notablemente dependiendo del tejido y del individuo y entre las variantes genéticas localizadas en el gen *ABCB1*, solo la *3435C>T* ha sido asociada a un descenso en la expresión del transportador (129), sobre todo en individuos con un genotipo *3435TT* (130, 131), y a un descenso en la expresión del ARNm (132, 133). Mientras que el polimorfismo *2677G>T/A* únicamente demostró un descenso en la expresión de ARNm.

Por todo esto, la variante *ABCB1 3435C>T* parece ser la de mayor relevancia farmacogenética.

7. POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA RESPUESTA A CLOPIDOGREL

El clopidogrel es un profármaco cuyo metabolito activo ha demostrado su eficacia como antiagregante plaquetario, al inhibir selectivamente la activación del complejo GPIIb-IIIa mediada por ADP. Ha demostrado una reducción de eventos CV mayores en el tratamiento de la EAP (21) y la ECV (21), particularmente en pacientes sometidos a ATP (6) y con implante de *stent* (134, 135).

Solo el 15% de la dosis total de clopidogrel se metaboliza a nivel hepático dando lugar a su metabolito activo. Esta biotransformación necesita de dos pasos oxidativos en los cuales participan multitud de enzimas, entre las cuales, el CYP2C19 parece ser una de las más significativas y la única que participa en ambos pasos (74). Mientras, el 85% de la dosis de clopidogrel restante, es hidrolizado por esterasas, dando lugar a metabolitos inactivos para su posterior eliminación (*Ver ilustración 1*).

Como ya hemos visto, el gen *CYP2C19*, que codifica la expresión de la enzima del mismo nombre es altamente polimórfico. Las variantes alélicas de este gen asociadas a una pérdida de función (*CYP2C19**2-*8) se heredan siguiendo un modelo codominante, esto implica que encontraremos diferencias en la respuesta antiagregante del clopidogrel entre los individuos homocigotos dominantes (*CYP2C19**1/*1) y los pacientes portadores de al menos un alelo LOF (heterocigotos: *CYP2C19**1/*2; u homocigotos recesivos: *CYP2C19**2/*2).

Entre todas las variantes LOF, el alelo *CYP2C19**2 (c.681G>A; rs4244285) es el único con una frecuencia mayor del 1% en nuestra población. La presencia de esta variante ha sido asociada con niveles más bajos de metabolito activo, con una disminución de la agregación plaquetaria y con un mayor riesgo de eventos CV mayores (136-142).

En cambio, la variante *17 (c.-806C>T; rs12248560) de este gen, es la

única asociada a un aumento de la actividad de la enzima, se traduce en un fenotipo UM y ha sido asociada a un aumento de la inhibición de la agregación plaquetaria y a un aumento en la respuesta antiagregante a clopidogrel (114, 137, 143, 144).

Por otro lado, la absorción intestinal de este fármaco se ve limitada por la influencia de la MDR1 o glicoproteína-P codificada por el gen *ABCB1*. El polimorfismo *ABCB1 C3435T* en este gen se relacionó significativamente con una disminución del pico máximo de concentración y del área bajo la curva de concentración plasmática en el tiempo en pacientes homocigotos recesivos (*ABCB1 3435 TT*) respecto heterocigotos o *wildtype* (*ABCB1 3435 CT* o *CC* respectivamente), de esta manera, ha demostrado influir en la biodisponibilidad del clopidogrel y en la prevención de eventos CV en pacientes tratados con este fármaco tras SCA (145).

Así, estas variaciones en los genes *CYP2C19* y *ABCB1* han demostrado significativamente estar asociados a la respuesta a clopidogrel en pacientes con SCA. Mega *et al.* demostraron en un sub-estudio genético del ensayo TRITON-TIMI 38 (*"Prasugrel compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction"*), en pacientes con SCA que habían sido sometidos a ICP y tratados con clopidogrel, que las variantes *CYP2C19*2* y *ABCB1 C3435T* eran predictores independientes de IAM, muerte CV e ictus. En este estudio, aquellos pacientes portadores del alelo *CYP2C19*2* o con un genotipo *ABCB1 3435 TT* duplicaron la tasa de eventos CV respecto los individuos que no portaban estas variaciones, y además, los individuos no portadores de estos polimorfismos mostraron una tasa de eventos similar a la mostrada en pacientes tratados con prasugrel para la misma indicación (146).

Mientras que el papel del *ABCB1 C3435T* ha dado lugar a resultados algo más contradictorios (147), los obtenidos para el *CYP2C19*2* han sido

replicados en multitud de estudios (148, 149) en pacientes con SCA.

Como podemos ver, la mayoría de los trabajos publicados evalúan la influencia de estos polimorfismos en la respuesta a clopidogrel en pacientes diagnosticados de SCA, y particularmente en pacientes sometidos a ICP; en cambio, en pacientes con EAP o ECV, las otras dos indicaciones de uso de clopidogrel, esta influencia permanece sin ser estudiada a fondo.

En el tratamiento de la EAP, un artículo publicado a finales de 2016 por Guo *et al.* asoció la presencia del alelo *CYP2C19*2* con un aumento del riesgo de eventos isquémicos (OR=6.82; IC95%= 1.81–25.67) (150). Esto, en pacientes asiáticos, en los cuales la frecuencia de este polimorfismo es significativamente mayor que en caucásicos. La influencia del *ABCB1 C3435T* y *CYP2C19*17* no ha sido estudiada hasta el momento en estos pacientes.

En el tratamiento del ictus o AIT, la influencia de polimorfismos genéticos en la respuesta a clopidogrel se ha estudiado algo más en profundidad que en individuos tratados por EAP, aunque no tan al detalle como en pacientes con SCA. Eso sí, entre todos los polimorfismos evaluados, solo los *CYP2C19* han demostrado influir significativamente en la respuesta a clopidogrel (151). Y aún con todo, los resultados obtenidos en los estudios realizados hasta el momento son contradictorios. De esta manera, algunos resultados mostraron una asociación entre la presencia de alelos *CYP2C19 LOF* y la recurrencia de ictus y eventos CV mayores (152, 153), mientras que otros no encontraron asociación alguna (154, 155).

La influencia de los polimorfismos *CYP2C19* sobre la respuesta a clopidogrel parece explicar en parte la eficacia variable de la doble antiagregación en pacientes con ECV respecto a pacientes coronarios. El ensayo CHANCE (“*Clopidogrel High-risk patients with Acute Nondisabling Cerebrovascular Events*”) (156), que valoró la eficacia y seguridad de la doble terapia antiagregante de clopidogrel con AAS frente AAS en monoterapia, en

pacientes tras AIT, demostró a través de un sub-estudio (157) genético que la doble terapia (AAS + clopidogrel) antiagregante reducía el riesgo de recurrencia de ictus únicamente en pacientes no portadores de polimorfismos *CYP2C19* LOF. Pero todo esto, sin valorar esta influencia en pacientes con ictus (solo AIT), y durante solo 3 meses de seguimiento.

Entre todos los estudios publicados hasta el momento que valoran la influencia que los polimorfismos genéticos tienen sobre la respuesta a clopidogrel en pacientes tras ictus o AIT, únicamente 3 lo hacen en cohortes de pacientes no asiáticos (155, 158, 159) y ninguno en una cohorte de pacientes exclusivamente europea; solo 1 hace un seguimiento de los pacientes mayor a 12 meses (155), y precisamente este, no incluye pacientes con ictus (solo AIT).

La *tabla 6* recoge los estudios publicados que evalúan, en pacientes con ictus o AIT, la influencia de los polimorfismos *CYP2C19* en la respuesta a clopidogrel. De esta tabla se han excluido los estudios con tiempo de seguimiento inferior a un mes o desconocido.

7.1 IMPORTANCIA CLÍNICA

La relevancia clínica de la farmacogenética en la actualidad, y en concreto del genotipado de polimorfismos *CYP2C19* en el tratamiento con clopidogrel, son hechos contrastados (160). La “*Food and Drug Administration*” (FDA) publicó, ya en 2010, un aviso indicando que los individuos *CYP2C19* PM podrían sufrir una disminución de la eficacia del fármaco, aumentando el riesgo de eventos CV importantes (161).

Esto dio lugar a que en ficha técnica del clopidogrel se recomiende el genotipado del *CYP2C19* previo al inicio del tratamiento en pacientes diagnosticados de SCA.

ESTUDIO AÑO (REF)	POBLACIÓN	DIAGNÓSTICO	N (%)*	EVENTO	T.S.	SNP CYP2C19
Jia <i>et al.</i> 2013 (153)	China	Ictus isquémico agudo	259 (100)	ictus	6 m	*2, *3
Lin <i>et al.</i> 2014 (152)	China	Ictus o AIT	90 (100)	Ictus, exitus, hemorragia	4.5 a	*2, *3
Zhang <i>et al.</i> 2014 (162)	China	Ictus isquémico agudo	95 (79.8)	Ictus y eventos isquémicos	6 m	*2, *3
Qiu <i>et al.</i> 2015 (154)	China	Ictus isquémico agudo	211 (100)	Ictus, IAM, muerte CV	6 m	*2, *3
Sun <i>et al.</i> 2015 (163)	China	Ictus isquémico (solo debut)	625 (100)	Muerte CV, ictus, IAM, sangrado	12 m	*2, *3, *17
Han <i>et al.</i> 2015 (164)	China	Ictus isquémico agudo	247 (71.6)	eventos CV mayores, ictus, AIT, muerte CV	12 m	*2, *3, *17
SPS3 2015 (155)	Todo el mundo	AIT	522 (17.3)	Ictus, sangrado	3.4 a	*2, *17
Fang <i>et al.</i> 2015 (165)	China	Ictus isquémico agudo	114 (100)	ictus	12 m	*2, *3
Hoh <i>et al.</i> 2016 (159)	USA	Ictus o AIT	188 (100)	ictus, AIT, IAM, exitus	12 m	*2, *3, *8, *17
Li <i>et al.</i> 2016 (166)	China	Ictus isquémico + stent	268 (100)	AIT, ictus, IAM, muerte CV	12 m	*2, *3, *17
Yi <i>et al.</i> 2016 (166, 167)	China	Ictus isquémico agudo	363 (96.8)	ictus, IAM, muerte CV	6 m	*2, *3
Zhu <i>et al.</i> 2016 (168)	China	Ictus isquémico + stent	241 (100)	Ictus, AIT, exitus	1 2m	*2, *3
CHANCE 2016 (157)	China	AIT	1.463 (56.6)	Ictus, IAM, muerte CV	3 m	*2, *3, *17

* % de los pacientes incluidos en el sub-estudio genético respecto al estudio original

REF: Referencia bibliográfica del estudio; T.S.: Tiempo de seguimiento; SNP: "Single Nucleotid Polymorphism"; m: meses; a: años; AIT: accidente isquémico transitorio; IAM: Infarto agudo de miocardio; CV: cardiovascular

Tabla 6: Estudios sobre la influencia de polimorfismos *CYP2C19* en la respuesta a clopidogrel en pacientes con ictus o AIT. (Modificado de (151))

En estos pacientes, de acuerdo con el genotipo *CYP2C19* podemos clasificar fenotípicamente a los individuos en EM (*CYP2C19**1/*1), IM (portadores de un alelo con pérdida de función), PM (portadores de 2 copias de algún alelo con pérdida de función) o UM (*CYP2C19**1/*17; *CYP2C19**17/*17).

FENOTIPO	GENOTIPO	DIPLO TIPO	IMPLICACIONES PARA EL CLOPIDOGREL	RECOM ENDACIÓN
Metabolizador Ultrarrápido (UM) (5-30% de los pacientes)	Individuo portador de mínimo un alelo con función aumentada (*17) y ningún alelo LOF (*2-*8)	*1/*17, *17/*17	Aumento de la inhibición de la agregación plaquetaria; disminución de la agregación plaquetaria	NO HAY: Seguir Pauta de dosificación y administración habitual.
Metabolizador NORMAL (EM) (35-50% de los pacientes)	Individuo portador de 2 alelos <i>wildtype</i> (*1)	*1/*1	Inhibición normal de la agregación plaquetaria; Agregación plaquetaria normal	NO HAY: Seguir Pauta de dosificación y administración habitual.
Metabolizador Intermedio (IM) (18-45% de los pacientes)	Individuo portador de un alelo <i>wildtype</i> (*1) o un alelo con función aumentada (*17) y un alelo LOF (*2-*8)	*1/*2, *1/*3, *2/*17	Inhibición de la agregación plaquetaria reducida. Aumento de la agregación plaquetaria. Aumento del riesgo de eventos CV.	Utilizar un tratamiento antiagregante alternativo (si fuera posible) Ej: Prasugrel, ticagrelor
Metabolizador Pobre (PM) (2-15% de los pacientes)	Individuo portador de 2 alelos LOF (*2-*8)	*2/*2, *2/*3, *3/*3	Inhibición de la agregación plaquetaria significativamente reducida. Aumento de la agregación plaquetaria. Aumento del riesgo de eventos CV.	Utilizar un tratamiento antiagregante alternativo (si fuera posible) Ej: Prasugrel, ticagrelor

Tabla 7: Recomendaciones terapéuticas en el tratamiento con clopidogrel en función del genotipo *CYP2C19* (Modificado de (169, 170))

Las principales guías de dosificación basadas en farmacogenética, las guías de la “*Dutch Pharmacogenetics Working Group*” (DPWG) (170) y del “*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*” (CPIC) (169), recomiendan el cambio de tratamiento antiagregante en pacientes tratados con clopidogrel, tras SCA, y habiendo sido sometidos a ICP (*Ver tabla 5*), que sean portadores de al menos un alelo *CYP2C19*2* (*CYP2C19* IM o PM). En pacientes EM y UM se recomienda continuar con la pauta habitual del tratamiento.

Los individuos con un alelo *CYP2C19*2* que además posean un alelo *CYP2C19*17*, asociado a un aumento de la actividad de la enzima, son clasificados según las guías como IM, debido a la falta de estudios que valoren el efecto de la presencia conjunta de ambos polimorfismos. Aunque, basándonos en la influencia independiente que ambos muestran sobre la efectividad del clopidogrel, se hipotetiza sobre la posible compensación en su efecto sobre la actividad de la enzima, y, por tanto, sobre la eficacia del clopidogrel.

En estos pacientes, con diagnóstico de SCA, incluso se demostró que la terapia antiagregante orientada en función del genotipo *CYP2C19*2*, siguiendo las recomendaciones terapéuticas recogidas en estas guías, conduce a una reducción de la tasa de eventos para la combinada de muerte CV, ictus o IAM (171).

Sin embargo, en pacientes tratados con clopidogrel por EAP o ECV, ante la falta de estudios que corroboren los resultados obtenidos en SCA, no existen guías de dosificación basadas en farmacogenética que valoren una posible alternativa en la estrategia terapéutica ante la influencia de estos polimorfismos sobre la eficacia del tratamiento. A pesar de que, en estos pacientes, el tratamiento precoz y efectivo sea fundamental.

Además, en el tratamiento de la EAP y ECV, en caso de necesitar una

terapia antiagregante, el arsenal terapéutico es mucho más limitado que en el tratamiento del SCA, al no haberse demostrado beneficio con el uso de los nuevos antiagregantes Prasugrel o Ticagrelor.

Por todo esto, estudiar la posible influencia de estos polimorfismos en la respuesta a clopidogrel en pacientes con EAP y/o ECV podría ayudar a predecir la respuesta de los individuos a este tratamiento, proporcionando información útil para el médico a la hora de decidir la mejor estrategia terapéutica para el paciente.

Además, podría explicar la respuesta variable que los individuos presentan frente clopidogrel.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

El clopidogrel es un profármaco, cuyo metabolito activo tiene un efecto antiagregante. Se utiliza en monoterapia o combinado con AAS en el tratamiento de SCA, EAP y ECV. Ha mostrado una mayor eficacia en pacientes cuanto mayor riesgo isquémico presentan. Su bioactivación consiste en dos pasos metabólicos mediados por algunas isoenzimas CYP, entre las cuales, el CYP2C19 parece ser la única involucrada en ambas reacciones; además, su absorción intestinal se ve condicionada en parte por la actividad del transportador ABCB1. Por tanto, una variación en la secuencia de ADN del gen que codifica la expresión de este transportador y la del CYP2C19, podría influir en la respuesta que los pacientes presentan a clopidogrel.

En pacientes con SCA sometidos a ICP tratados con clopidogrel, los polimorfismos *CYP2C19*2* y *ABCB1 C3435T* han sido asociados con una respuesta variable a clopidogrel. La presencia del *CYP2C19*2* y el genotipo *ABCB1 3435TT* con un menor efecto antiagregante y mayor riesgo de eventos CV mayores; y el genotipo *CYP2C19*17/*17* con un mayor efecto antiagregante y riesgo de sangrado. Todo esto ha dado lugar a que se recomendará, en ficha técnica del clopidogrel, genotipar la presencia del *CYP2C19*2* previo al inicio del tratamiento, además, la FDA emitió un aviso indicando que los pacientes portadores de este SNP tenían un riesgo elevado de tener un efecto antiagregante ineficiente.

En pacientes con EAP, la influencia de estos polimorfismos en la respuesta a clopidogrel todavía no ha sido estudiada y en pacientes con ECV los estudios publicados no valoran esta influencia en tratamientos de larga duración (más de 12 meses) en pacientes con ictus (solo tras AIT).

Así, la hipótesis principal de este trabajo es que los polimorfismos

*CYP2C19*2, *17 y ABCB1 C3534T* están asociados a una respuesta variable a clopidogrel en pacientes con ECV y EAP; y conocer de qué manera influyen, puede ayudar a seleccionar la mejor estrategia terapéutica para estos pacientes, con un arsenal terapéutico antiagregante más limitado que en las otras indicaciones de uso del clopidogrel.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMARIO

1. Valorar la influencia de los polimorfismos *CYP2C19**2 (c.681G>A; rs4244285), *17 (c.- 806C>T; rs12248560) y *ABCB1* *C3435T* (c.3435C>T; rs1045642) sobre la eficacia de clopidogrel en pacientes con EAP sometidos a ATP (alto riesgo isquémico).

- De forma independiente, o estudiando la presencia combinada de estos polimorfismos en los pacientes reclutados.
- Mediante un estudio bivariante, y también multivariante teniendo en cuenta las covariables que han demostrado su asociación con la eficacia del clopidogrel en nuestra población.

2. Valorar la influencia de los mismos polimorfismos sobre la eficacia de clopidogrel en pacientes que han sufrido un ictus o AIT (menor riesgo isquémico).

- De forma independiente, o estudiando la presencia combinada de estos polimorfismos en los pacientes reclutados.
- Mediante un estudio bivariante, y también multivariante teniendo en cuenta las covariables que han demostrado su asociación con la eficacia del clopidogrel en nuestra población.

2.2 OBJETIVO SECUNDARIO

1. Estudiar el valor predictivo sobre la eficacia del clopidogrel de estos polimorfismos; estudiando su asociación con las principales variables clínicas utilizadas para valorar la evolución de los pacientes con EAP:

- ITB.
- PVR.
- Distancia de claudicación.
- Grado de Fontaine/Rutherford



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Para dar respuesta a los objetivos propuestos se realizaron dos estudios independientes. Por un lado, se comparó la influencia de los SNP *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17* y *ABCB1 C3435T* en la respuesta a clopidogrel en pacientes con EAP sometidos a ATP, y por otro, en pacientes con ictus o tras haber sufrido un AIT.

1. ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA Y ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÁNEA

1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio observacional de cohortes retrospectivo y unicéntrico. El tiempo de seguimiento fue de 12 meses. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética de investigación biomédica de la provincia de Granada (*Ver anexo 1*).

1.2 CÁLCULO MUESTRAL

El cálculo muestral se llevó a cabo a partir del número de pacientes incluidos en el estudio publicado por Guo *et al.*(150). Para alcanzar un 80% de potencia al detectar diferencias en la hipótesis nula ($H_0: p_1 = p_2$) mediante el test chi-cuadrado para dos muestras bilaterales independientes, considerando un nivel de significación del 5% y considerando que la proporción de pacientes que presentan un evento isquémico en 12 meses de seguimiento sin ser *CYP2C19* LOF es el 16.6%, y que el 57.7% de los pacientes LOF presentan este evento durante el mismo tiempo de seguimiento. Teniendo en cuenta estas condiciones, sería necesario incluir 21 pacientes en cada grupo, sumando un total de 42 pacientes en el estudio.

Considerando un porcentaje de pérdidas del 10%, es necesario reclutar 48 pacientes para la realización de este estudio.

1.3 PACIENTES Y TRATAMIENTO

1.3.1 Población de estudio

Se reclutaron pacientes diagnosticados de EAP de miembros inferiores que fueron sometidos a una ATP, y que fueron tratados con clopidogrel desde el momento en que se llevó a cabo la cirugía, que además fueron intervenidos quirúrgicamente en el servicio de angiología y cirugía vascular del Hospital clínico Universitario San Cecilio (HUSC) en Granada entre los años 2010 y 2013.

1.3.2 Reclutamiento:

Para el reclutamiento se solicitó al servicio de documentación clínica del HUSC los Números Únicos de Historia de Salud de Andalucía (NUHSA) de los pacientes que recogían los términos “enfermedad arterial periférica” o “isquemia crónica”. Por otro lado, se cotejó cuáles de los pacientes asociados a estos NUHSA habían sido sometidos a una ATP de miembros inferiores, consultando los informes quirúrgicos fechados entre los años 2010 y 2013 archivados en el servicio de cirugía vascular y angiología de nuestro hospital.

Hecho esto, se cruzaron los NUHSA resultantes con los datos de consumo de clopidogrel en Andalucía y se comprobó que la prescripción de clopidogrel coincidiera en tiempo con la fecha en la que se sometieron a estos pacientes a una ATP de miembros inferiores, obteniendo así la lista de pacientes candidatos a ser incluidos en el estudio.

Todos los pacientes fueron reclutados aprovechando una de sus revisiones periódicas en el servicio de cirugía vascular y angiología del HUSC a fin de suponerles la menor molestia posible debido al perfil habitual de estos (avanzada edad y pluripatológicos).

En el momento de ser reclutados todos los pacientes participantes firmaron el consentimiento informado (CI) (*Ver anexo 2*). Este CI cumple los

principios recogidos en la Declaración de Helsinki.

Todos los individuos debían cumplir los criterios de inclusión y no cumplir los criterios de exclusión del estudio.

1.3.3 Criterios de inclusión:

1. Ser mayor de 18 años.
2. Diagnosticado de EAP y sometidos a ATP.
3. Tratados con 75 mg diarios de clopidogrel después de la cirugía durante al menos 3 meses.
4. Ser capaz de donar saliva.
5. Dar el consentimiento voluntario para la participación en el estudio mediante la firma del consentimiento informado (*Ver anexo 2*).

1.3.4 Criterio de exclusión:

1. Estar contraindicado el tratamiento con clopidogrel.
2. Necesidad de tratamiento anticoagulante.
3. Imposibilidad de estudiar la historia clínica durante el tiempo de tratamiento.

1.4 EVALUACIÓN CLÍNICA

Los datos de la evolución clínica (eventos primario y secundarios) y covariables del estudio se obtuvieron de la historia clínica digitalizada de los pacientes, utilizando los recursos informáticos “Archinet”, que es la aplicación informática de historias clínicas del HUSC, y “Diraya de Atención Especializada” (DAE), que cumple la misma función a nivel de toda la comunidad autónoma andaluza; además, para la obtención de esta información, también se utilizaron los informes quirúrgicos archivados en el servicio de cirugía vascular y angiología de nuestro hospital.

Se estudió la asociación entre la presencia de los polimorfismos

*CYP2C19*2*, **17* y *ABCB1 C3434T*, de manera independiente y combinados entre sí, frente a la aparición de los eventos primarios y secundarios, durante el tiempo de tratamiento con clopidogrel y hasta 12 meses después de *baseline* (BL), considerado BL el primer día de tratamiento con clopidogrel después de someter al paciente a la ATP.

1.4.1 Variables Respuesta (dependientes):

– Evento primario:

- Evento isquémico: Variable categórica nominal.

Valores que toma: Si / No.

Como variable clínica (variable respuesta del estudio) de eficacia o evento primario, se estudió la: “aparición de una re-estenosis u oclusión del territorio vascular intervenido en la cirugía” (evento isquémico). Para ser considerado un evento, el diagnóstico de esta re-estenosis/oclusión debía probarse por ultrasonido (Doppler) y ser aceptado por un cirujano vascular ciego para los resultados genéticos.

– Eventos secundarios:

Se recogieron datos de la historia clínica de los pacientes relativos a la distancia de claudicación, ITB, PVR y clasificación de Fontaine, reportada por los médicos, en BL ($t=0$), y tras 3, 6, 9 y 12 meses (± 1 mes) desde el alta hospitalaria después de la cirugía:

1. Claudicación intermitente:

- Distancia de claudicación (DC): Variable categórica en escala.

Valores que toma: No claudicación / >500m / >150m / <150m

- Evolución de la Ci: Variable categórica nominal.

Valores que toma: Buena evolución / Mala evolución.

Se estratificó la distancia de claudicación en una escala de cuatro

niveles (Ver tabla 8) y se clasificó a los pacientes en función de esta escala en t=0 y tras 3, 6, 9 y 12 meses de evolución. Se clasificó a los pacientes en “mala evolución” o “buena evolución” de la Ci. Se consideró mala evolución la disminución de la distancia de claudicación medida como el aumento de un nivel en esta escala desde BL durante el tiempo de seguimiento. Se consideró una buena evolución de la Ci el no empeoramiento de la distancia de claudicación en este tiempo.

NIVEL	DISTANCIA DE CLAUDICACIÓN
Nivel 1	No presenta claudicación intermitente
Nivel 2	A partir de 500 m (DC > 500m)
Nivel 3	Entre 500 y 150 m (150m < DC < 500m)
Nivel 4	Menos de 150m (DC < 150)

Tabla 8: Clasificación en niveles de la distancia de claudicación

2. Índice tobillo – brazo (ITB):

- ITB: Variable cuantitativa continua.
- Evolución del ITB: Variable categórica nominal.

Valores que toma: Buena evolución / Mala evolución.

Se clasificó a los pacientes en “mala evolución” o “buena evolución” del ITB, considerando mala evolución una disminución del ITB igual o mayor del 20% desde BL durante el tiempo de seguimiento. Se consideró una buena evolución el resto de los casos, es decir, aumento, o disminución del ITB < 20% en este tiempo.

3. Pletismografía (PVR):

- PVR: Variable categórica en escala.

Valores que toma: 1, 2, 3.

- Evolución del PVR: Variable categórica nominal.

Valores que toma: Buena evolución / Mala evolución.

Se estratificó a los pacientes en 3 niveles en función del estado de las ondas pletismográficas de cada individuo, siendo el nivel más alto (nivel 3) el que representa un estado óptimo de las ondas valorado por el equipo médico. Tras esto, se clasificó a los pacientes en función de esta escala en $t=0$ y tras 3, 6, 9 y 12 meses de evolución. Se consideró “mala evolución” un descenso de un nivel en esta escala desde BL durante el tiempo de seguimiento. Se consideró “buena evolución” el no descenso en esta escala desde BL durante 12 meses.

4. Clasificación de Fontaine:

- Clasificación de Fontaine: Variable categórica en escala

Valores que toma: I, IIa, IIb, III, IVa, IVb, V, VI.

- Evolución de Fontaine: Variable categórica nominal.

Valores que toma: Buena evolución / Mala evolución.

Se valoró a los individuos en función de la clasificación de Fontaine-Rutherford (Ver Introducción, Tabla 1) en BL y tras 3, 6, 9 y 12 meses. Se clasificó a los pacientes en mala o buena evolución. Se consideró “mala evolución” si los pacientes aumentaban al menos un nivel en esta clasificación desde BL durante el tiempo de seguimiento.

5. Necesidad de reintervenir quirúrgicamente al paciente o amputar el miembro afectado después de haber sufrido el evento primario: Variable categórica nominal.

Valores que toma: Si / No.

1.4.2 Variables genéticas (Independientes):

El día del reclutamiento, se obtuvo de los pacientes una muestra de saliva utilizando hisopos estériles, a partir de la cual se aisló el ADN de los individuos. Sobre este ADN se estudió el genotipo de los pacientes para los siguientes polimorfismos:

– *CYP2C19* *2; G>A (c.681G>A; rs4244285):

En función de su genotipo, los pacientes se clasificaron en:

1. *CYP2C19* LOF: Portadores de al menos un alelo asociado a una pérdida de función de la enzima *CYP2C19* (“*loss of function*”, LOF).
 - Genotipos: *CYP2C19* *1/*2 (Heterocigotos), *CYP2C19**2/*2 (Homocigotos recesivos).
2. *CYP2C19* No-LOF: No portadores de alelos con pérdida de función (no-LOF).
 - Genotipo: *CYP2C19**1/*1 (Homocigotos dominantes).

– *CYP2C19* *17; C>T (c.-806C>T; rs12248560):

En función de su genotipo, los pacientes se clasificaron en:

1. *CYP2C19* GOF: Portadores de al menos un alelo asociado a una ganancia de función de la enzima *CYP2C19* (“*gain of function*”, GOF).
 - Genotipos: *CYP2C19* *17/*17 (Homocigotos recesivos) o *CYP2C19**1/*17 (Heterocigotos)
2. *CYP2C19* No-GOF: No portadores de alelos con ganancia de función (no-GOF).
 - Genotipo: *CYP2C19**1/*1 (Homocigotos dominantes).

– *ABCB1* C3435T; C>T (c.3435C>T; rs1045642):

En función de su genotipo, los pacientes se clasificaron en:

1. *ABCB1* LOF: Portadores de 2 alelos asociados con una menor

absorción del fármaco.

- Genotipo: *ABCB1 3435TT* (Homocigotos recesivos)
2. *ABCB1* no-LOF: Portadores de uno o ningún alelo asociado con una menor absorción del fármaco.
 - Genotipos: *ABCB1 3435CC* (Homocigotos dominantes) o *ABCB1 3435CT* (Heterocigotos).

1.4.3 Covariables:

Además de la información relativa a las variables respuesta e independientes de este estudio, se recogió información en BL sobre el resto de las variables que han demostrado estar asociadas a la eficacia del clopidogrel y/o que pueden tener una influencia sobre la aparición del evento primario del estudio:

– Variables clínicas:

1. Edad: Variable cuantitativa continua (en años). Medida el día después de la cirugía (ATP).
2. Sexo: Variable categórica nominal.
Valores: Hombre / mujer.
3. Raza: Variable categórica nominal.
Valores: Caucásica / negra / otras.

– Factores de riesgo:

Se recogió si la población incluida en el estudio presentaba alguno de los siguientes factores de riesgo en BL.

1. Diabetes: Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
2. Hipertensión arterial (HTA): Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
3. Hipercolesterolemia: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

4. Estatus de fumador (Tabaquismo): Variable categórica nominal. Se consideró como “SI” en esta variable, aquellos pacientes que fueron fumadores en algún momento desde el diagnóstico de la EAP, pero no necesariamente tenían que ser fumadores en BL.

Valores: Si / No

5. Enfermedad renal: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

6. Antecedentes personales de enfermedad cardiovascular (Antecedentes CV): Variable categórica nominal. Incluye los antecedentes de EAP y/o AIT y/o ictus y/o SCA. Se consideró como “SI” en esta variable, aquellos pacientes que presentaron alguno de estos diagnósticos, siempre que hubieran supuesto un ingreso hospitalario.

Valores: Si / No

– Tratamiento farmacológico concomitante durante el seguimiento:

1. AAS: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

2. Heparinas de bajo peso molecular (HBPM): Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

3. Estatinas: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

4. Cilostazol: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

5. B-Bloqueantes: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

6. IECA: Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
7. ARAI: Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
8. Inhibidores de la bomba de protones (IBP): Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
 - Variables quirúrgicas y relacionadas con la severidad de la enfermedad:
 1. Distancia de claudicación: Variable categórica en escala.
Valores: No claudicación / >500 m / >150 m / <150 m
 2. Número de regiones tratadas: Variable categórica en escala. Para evaluar el nivel de afectación del miembro inferior isquémico de los pacientes, estos se dividieron considerando 3 territorios vasculares: Ilíaco, femoral y distal (tibial hasta el tobillo). Se midió después de la cirugía el número de territorios vasculares que necesitaron ser intervenidos durante la cirugía (ATP).
Valores: 1, 2, 3.
 3. ITB: Variable cuantitativa continua.
 4. Balón recubierto: Variable categórica nominal. Se midió si durante la ATP realizada se utilizó un balón recubierto de drogas.
Valores: Si / No
 5. *Stent*: Variable categórica nominal. Se midió si fue necesaria la implantación de un *stent* en el territorio vascular intervenido durante la ATP.
Valores: Si / No

1.5 METAANÁLISIS

En pacientes con ECV, como hemos comentado, existen estudios evaluando la influencia de polimorfismos *CYP2C19* y *ABCB1* en la respuesta a clopidogrel, e incluso se han publicado revisiones y realizado metaanálisis valorando esta asociación (151). En cambio, en pacientes con EAP, hemos visto que se ha publicado un artículo estudiando la influencia de la presencia del *CYP2C19*2* sobre la eficacia del clopidogrel en estos pacientes.

Por esto se decidió realizar un metaanálisis, con el fin de verificar la ausencia de estudios en esta indicación en población caucásica o valorando polimorfismos *ABCB1*.

Para realizar este metaanálisis, se llevó a cabo una búsqueda sistemática de literatura en PUBMED en octubre de 2015 usando los siguientes términos MeSH (*Medical Subject Headings*): clopidogrel, *CYP2C19*, *ABCB1*, polymorphism, single nucleotide, peripheral artery disease (EAP en español) o percutaneous transluminal angioplasty (ATP en español).

Los abstracts de los artículos encontrados se revisaron y se seleccionaron aquellos que evaluaban la respuesta de clopidogrel en individuos con EAP, que estuvieran publicados en una revista de impacto y excluyendo aquellos trabajos consistentes en revisiones bibliográficas.

Combinando los resultados del único artículo publicado y los obtenidos en nuestro estudio, evaluamos cómo influye el SNP *CYP2C19*2*:

1. En primer lugar, en la aparición de una re-estenosis u oclusión de las lesiones tratadas durante la cirugía (ATP) y diagnosticados por ultrasonido (evento primario) durante 12 meses después de la ATP.
2. Si los pacientes que presentaron este evento primario necesitaron una posterior reintervención quirúrgica o supusieron la amputación del miembro afectado.

2. ICTUS O ACCIDENTE ISQUÉMICO TRANSITORIO

2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio observacional de cohortes retrospectivo y unicéntrico. El tiempo de seguimiento duró desde la fecha de diagnóstico hasta el 31 de Julio de 2017. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética del HUSC en Granada (*Ver anexo 3*).

2.2 CÁLCULO MUESTRAL

Para este segundo estudio se reclutaron todos los pacientes con ECV (ictus o AIT) entre los años 2010 y 2013 en nuestro hospital, que fueron tratados con clopidogrel tras el diagnóstico. Esto fue así porque, basándonos en el cálculo muestra del estudio en pacientes con EAP y teniendo en cuenta que la proporción del evento primario es menor, hubiéramos tenido que extender el periodo de reclutamiento durante más de 5 años, periodo suficiente para que fuera la propia evolución de la práctica clínica normal la que se relacionara significativamente con la aparición del evento primario.

Esto suponía un tamaño de muestra previsto de unos 70 pacientes y un 20% de pacientes expresando el evento primario. Con este tamaño de muestra y esta proporción se podrá conseguir una precisión del 9,75% en la estimación de la presencia del evento a través de un intervalo de confianza asintótico Normal al 95% bilateral.

2.3 PACIENTES Y TRATAMIENTO

2.3.1 Población de estudio:

Se reclutaron los pacientes diagnosticados de ictus o AIT en la unidad de Neurología del HUSC en Granada entre los años 2010 – 2013, y tratados con clopidogrel desde el diagnóstico durante al menos 1 mes.

2.3.2 Reclutamiento:

Para el reclutamiento se solicitó al servicio de documentación clínica del HUSC los NUHSA de los pacientes que recogían los términos “ictus” o “AIT” o “enfermedad cerebrovascular” o “ECV” en su historia clínica.

Hecho esto se cruzaron los NUHSA resultantes con los datos de consumo de clopidogrel en Andalucía y se comprobó que la prescripción coincidiera en tiempo con la fecha del diagnóstico de ictus o AIT, obteniendo así la lista de pacientes candidatos a ser incluidos en el estudio.

Todos los pacientes fueron reclutados aprovechando una de sus revisiones periódicas en el servicio de Neurología del HUSC a fin de suponerles la menor molestia posible debido al perfil habitual de estos, al igual que los pacientes diagnosticados de EAP, habitualmente de avanzada edad y pluripatológicos. En el momento de ser reclutados todos los pacientes participantes firmaron el consentimiento informado (*Ver anexo 4*). Este consentimiento informado cumple los principios recogidos en la Declaración de Helsinki.

Todos los individuos debían cumplir los criterios de inclusión y no cumplir los criterios de exclusión del estudio.

2.3.3 Criterios de inclusión:

1. Mayor de 18 años.
2. Diagnóstico de ictus / AIT.
3. Tratamiento con 75 mg/día de clopidogrel desde el diagnóstico hasta después del alta.
4. Duración mínima del tratamiento con clopidogrel de 1 mes.
5. Firma del consentimiento informado (*Ver anexo 4*).
6. Capaz de donar saliva.

2.3.4 Criterios de exclusión:

1. Estar contraindicado el tratamiento con clopidogrel.
2. Necesidad de tratamiento anticoagulante.
3. Imposibilidad de estudiar la historia clínica durante el tiempo de tratamiento.

2.4 EVALUACIÓN CLÍNICA

Se estudió la asociación entre la presencia de los polimorfismos *CYP2C19*2*, **17* y *ABCB1 C3434T*, de manera independiente y combinados entre sí, frente la aparición del evento primario. El tiempo de seguimiento duró desde la fecha de diagnóstico del ictus o AIT, durante el tiempo en tratamiento con clopidogrel y/o hasta el 31 de Julio de 2017.

Los datos de la evolución clínica (evento primario y secundarios) y covariables del estudio se obtuvieron de la historia clínica digitalizada de los pacientes, utilizando los recursos informáticos ARCHINET y DAE.

2.4.1 Variable Respuesta (dependiente):

– Evento primario:

Como variable clínica (variable respuesta del estudio) de eficacia o evento primario, se midió la combinada de muerte CV, ictus / AIT e IAM.

Los IAM, ictus y AIT, debieron suponer el ingreso hospitalario del paciente para ser considerados evento primario.

2.4.2 Variables genéticas (Independientes):

El día del reclutamiento, se obtuvo de los pacientes una muestra de saliva utilizando hisopos estériles, a partir de la cual se aisló el ADN de los individuos. Sobre este ADN se estudió el genotipo de los pacientes para los siguientes polimorfismos:

– *CYP2C19* *2; G>A (c.681G>A; rs4244285):

En función de su genotipo, los pacientes se clasificaron en:

1. *CYP2C19* LOF: Portadores de alelo asociado a una pérdida de función de la enzima *CYP2C19* (“*loss of function*”, LOF).
 - Genotipos: *CYP2C19**1/*2 (Heterocigotos), *CYP2C19**2/*2 (Homocigotos recesivos).
2. *CYP2C19* No-LOF: No portadores de alelos con pérdida de función (no-LOF).
 - Genotipo: *CYP2C19**1/*1 (Homocigotos dominantes).

– *CYP2C19* *17; C>T (c.-806C>T; rs12248560):

En función de su genotipo, los pacientes se clasificaron en:

1. *CYP2C19* GOF: Portadores de al menos un alelo asociado a una ganancia de función de la enzima *CYP2C19* (“*gain of function*”, GOF).
 - Genotipos: *CYP2C19**17/*17 (Homocigotos recesivos) o *CYP2C19**1/*17 (Heterocigotos).
2. *CYP2C19* No-GOF: No portadores de alelos con ganancia de función (no-GOF).
 - Genotipo: *CYP2C19**1/*1 (Homocigotos dominantes).

– *ABCB1* C3435T; C>T (c.3435C>T; rs1045642):

En función de su genotipo, los pacientes se clasificaron en:

1. *ABCB1* LOF: Portadores de 2 alelos asociados con una menor absorción del fármaco.
 - Genotipo: *ABCB1* 3435TT (Homocigotos recesivos)
2. *ABCB1* no-LOF: Portadores de 1 o ningún alelo asociado con una menor absorción del fármaco.
 - Genotipos: *ABCB1* 3435CC (Homocigotos dominantes) o *ABCB1*

3435CT (Heterocigotos).

2.4.3 Covariables:

– Variables clínicas:

1. Edad: Variable cuantitativa continua (en años). Medida el día del diagnóstico del ictus/AIT.
2. Sexo: Variable categórica nominal.
Valores: Hombre / mujer.
3. Raza: Variable categórica nominal.
Valores: Caucásica / negra / otras.

– Factores de riesgo:

Se recogió si la población incluida en el estudio presentaba alguno de los siguientes factores de riesgo en BL.

1. Diabetes: Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
2. HTA: Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
3. Hipercolesterolemia: Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
4. Estatus de fumador (Tabaquismo): Variable categórica nominal.
Valores: Si / No
5. Antecedentes personales de enfermedad cardiológica (EC previa):
Variable categórica nominal. Se consideró como “Si” en esta variable, aquellos pacientes que fueron diagnosticados de cualquier problema cardiológico que necesitara de un ingreso hospitalario en cualquier momento antes del ictus/AIT por el que se reclutó al paciente.
Valores: Si / No
6. Antecedentes personales de ictus o AIT (AIT/ictus previo): Variable

categoría nominal. Se consideró como “SI” en esta variable, aquellos pacientes que fueron diagnosticados de ictus o AIT previo al diagnóstico por el que se reclutó al paciente, siempre que supusiera un ingreso hospitalario.

Valores: Si / No

– Tratamiento farmacológico concomitante durante el seguimiento:

1. AAS: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

2. Estatinas: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

3. B-Bloqueantes: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

4. IECA: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

5. ARAII: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

6. Antagonistas del Ca: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

7. IBP: Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

– Variables quirúrgicas y relacionadas con la severidad de la enfermedad:

1. Estar en tratamiento antiagregante previo al ictus o AIT por el que se recluta (Antiagregante previo): Variable categórica nominal.

Valores: Si / No

2. Haber sido sometido a cirugía de carótida (Cirugía): Variable categórica nominal. Se consideró como “SI” en esta variable en

aquellos pacientes que fueron sometidos a una cirugía de carótida secundaria al ictus por el que se recluta.

Valores: Si / No

3. Presencia de *stent* en carótida (*Stent*): Variable categórica nominal.

Se consideró como “Si” en esta variable en aquellos pacientes que, durante la cirugía realizada debido al diagnóstico de ictus por el que se recluta, se les implantó un *stent* a nivel de la arteria carótida.

Valores: Si / No

3. CIRCUITO DE PACIENTES Y PROCEDIMIENTO

Una vez proporcionada la lista de pacientes candidatos a ser incluidos en ambos estudios por el servicio de documentación clínica del HUSC, se realizó una búsqueda de la consulta o cita de cualquier tipo más próxima en el tiempo, que cada paciente tuviera en nuestro centro. Para esto se utilizó la aplicación CITAWEB (Diraya citación) del Servicio Andaluz de Salud (SAS) y Consejería de Salud de Andalucía.

Una vez localizados los pacientes, se consultó sobre la disponibilidad en tiempo y espacio a los profesionales sanitarios responsables de éstos durante las citas encontradas, para informar a los pacientes sobre la realización de los estudios que acabamos de describir.

3.1 INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Teniendo la conformidad de su médico responsable y del paciente para reunirnos, procedimos a informar al paciente sobre la realización del estudio.

El investigador responsable informó a cada paciente sobre la voluntariedad de su participación, detallando que, debido a la naturaleza observacional y retrospectiva de este, no supondría ninguna variación o intervención en el tratamiento que hubiera recibido si no participase en el estudio, y de los posibles beneficios futuros que esta participación pudiera suponer, tanto sobre el propio paciente, como para el resto de la sociedad. Para esto, se entregó a cada paciente una “Hoja de información al paciente” (*Ver anexos 2 y 4*).

A continuación, se invitó a cada paciente candidato a ser reclutado, que preguntase cualquier duda que le surgiera y se le invitó formalmente a participar en el estudio proporcionando el consentimiento informado para su firma.

Una vez firmado el consentimiento por cada uno de los pacientes, este fue firmado también por el profesional sanitario que informó al paciente de los detalles relativos a la participación en el estudio. Por último, se recordó al paciente que podía solicitar en cualquier momento la revocación de éste al equipo investigador.

Una vez firmados por paciente y profesional sanitario investigador, los consentimientos informados se archivaron bajo llave en el servicio de farmacia del HUSC y posteriormente fueron trasladados al Hospital del Campus de la Salud del Parque Tecnológico de la Salud (PTS) de Granada, ubicándolos también bajo llave en el despacho del área de farmacogenética del servicio de Farmacia de este hospital.

3.2 TOMA DE MUESTRAS

Habiendo obtenido por escrito el consentimiento del paciente para su participación en el estudio, se le tomaron 4 muestras de saliva, utilizando hisopos estériles (torundas) sin medio de cultivo.

Aunque una sola muestra hubiera sido suficiente para el análisis genético previsto, se realizaron 4 tomas con el fin de genotipar la presencia de cada uno de los polimorfismos estudiados por duplicado, y también tratando de prever la posible necesidad de repetir una extracción de ADN de uno de los hisopos ante la escasez de material genético.

La utilización de este método se escogió intentando facilitar dentro de lo posible la participación de los pacientes, por ser un método indoloro y mínimamente invasivo. Además, el uso de hisopos estériles facilitó en gran medida la posterior manipulación y análisis de las muestras respecto lo que hubiera supuesto el uso de otros tipos de muestra, como la saliva en esputo, o la sangre, ya sea capilar o mediante extracción.

3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenidas las muestras de saliva de cada paciente, estas se anonimizaron proporcionando un código a cada paciente y sus muestras. La relación código-paciente se guardó en una base de datos diseñada para este fin y cifrada para su acceso, a la cual solo puede acceder el equipo investigador dentro del ámbito hospitalario.

Las muestras de saliva se enviaron anonimizadas al Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía - de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) en Granada.

3.4 EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO

Una vez recibidas las muestras biológicas en GENYO se procedía a la extracción del ADN a partir de las células de la mucosa bucal. Esto se realizó en menos de 48h desde cada toma.

La extracción del ADN de las muestras se llevó a cabo utilizando procedimientos orgánicos y el genotipado de los polimorfismos estudiados se realizó mediante sondas *Taqman*[®]. Los detalles de este proceso se describen más adelante.

El genotipado de las muestras se llevó a cabo por duplicado a fin de garantizar la veracidad de los resultados.

4. EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO

La obtención de células de la mucosa bucal y posterior extracción de ADN se realizaron mediante el método descrito por Freeman *et al.* (172) con las modificaciones realizadas por Gómez-Martín A. *et al.* (173)

Así, en primer lugar, se obtuvieron células de la mucosa bucal utilizando hisopos estériles con capucha de algodón y bastón plástico.

Del algodón del hisopo, utilizado para arrastrar las células de la mucosa bucal, se obtiene una pequeña porción que se corta y se introduce en un tubo de plástico de 15 mL junto con el medio de colección (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8, 0.5% wt/vol SDS) y Proteinasa K (0.2 mg/mL). De este modo, se almacenaban las muestras hasta que se deseaba extraer el DNA, cuando el número de muestras era suficiente, lo cual abarataba sensiblemente el procedimiento.

En este momento se centrifugan (4 min 400 g. *av*) y se incuban las muestras (65°C, 2h) para activar la proteinasa K; tras esto, se vuelven a centrifugar para recuperar la condensación producida durante la incubación y se vierte el contenido a tubos de 50 mL eliminando el trozo de algodón que contenía las células originales de la mucosa bucal. Hecho esto, se centrifuga, se elimina el sobrenadante y se añade el acetato de amonio [2M] para eliminar las proteínas, agitando manualmente durante 30 s y centrifugando a 5.000 g durante 25 min.

Tras esto, se añade alcohol isopropílico para hacer precipitar el ADN extraído centrifugando a 5.000 g *av* durante 25 minutos. Por último, se desecha el alcohol isopropílico y se re-suspende la muestra en 500 µL de Tris-EDTA, almacenándose a -20°C hasta que se procede al genotipado.

(Ver Ilustración 2)

Una vez extraído el ADN de las células contenidas en la muestra de saliva

MATERIAL Y MÉTODOS

de cada paciente, se genotiparon los polimorfismos *CYP2C19*2* (rs4244285), *CYP2C19*17* (rs12248560) y *ABCB1 C3435T* (rs1045642).

Un genotipado es el procedimiento por el cual llegamos a conocer la secuencia genética que presenta un individuo en un lugar determinado de su genoma, a fin de conocer las diferencias que presenta respecto a otros individuos.



Ilustración 2: Extracción de ADN

El genotipado de los polimorfismos estudiados se llevó a cabo mediante discriminación alélica utilizando ensayos de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) cuantitativa a tiempo real (*Quantitative real-time PCR*”, qPCR). Para esto, se utilizaron sondas de hibridación alelo-específicas Taqman®MGB de *Life Technologies*® (Foster City, CA - EE. UU).

Mediante este método, somos capaces de detectar una variación genética mediante la unión de un fragmento de ADN complementario al lugar donde se encuentra el polimorfismo, estando marcado con un

fluorocromo que se libera tras esta unión.

Este método aprovecha la actividad exonucleasa 5'->3' de la *Taq DNA polimerasa* (*Thermus aquaticus* DNA polimerasa) para así degradar la sonda de hibridación durante la amplificación del ADN por PCR (174).

Las sondas Taqman® son oligonucleótidos de origen sintético marcados con un fluorocromo en el extremo 5' (fluorocromo donador o *reporter*) cuya fluorescencia se mantiene inhibida por la presencia de un inhibidor (apantallador o *quencher*) en el extremo 3'; además, la sonda no es extensible por este extremo.

Estas sondas están diseñadas para hibridar por complementariedad de bases con el producto de la PCR (ADN del paciente), en el cual se encuentra la posición que contiene el polimorfismo de interés.

De este modo, al aplicar estas sondas sobre el ADN a interrogar, en caso de ser portador el polimorfismo estudiado, la sonda hibridará con el ADN y durante la PCR, la *Taq DNA polimerasa* hidrolizará la cadena híbrida, debido a su actividad exonucleasa, liberando el *reporter* y, por tanto, emitiendo una fluorescencia que aumenta a medida que este se aleja del *quencher*.

En nuestro caso, no solo queremos determinar la presencia de un polimorfismo, sino que queremos caracterizar el genotipo del paciente para ese polimorfismo, es decir, queremos saber si es homocigoto dominante, recesivo o heterocigoto.

Para esto se utilizó el ensayo *TaqMan SNP Genotyping Assay for Life Technologies*®. Este método se basa en los mismos principios que lo que acabamos de describir, pero con 2 sondas TaqMan diferentes (*FAM*® *dye* y *VIC*® *dye*), capaces de emitir fluorescencia en un espectro de excitación y emisión diferentes. Cada una de estas sondas hibridará con cada uno de los alelos posibles del polimorfismo estudiado.

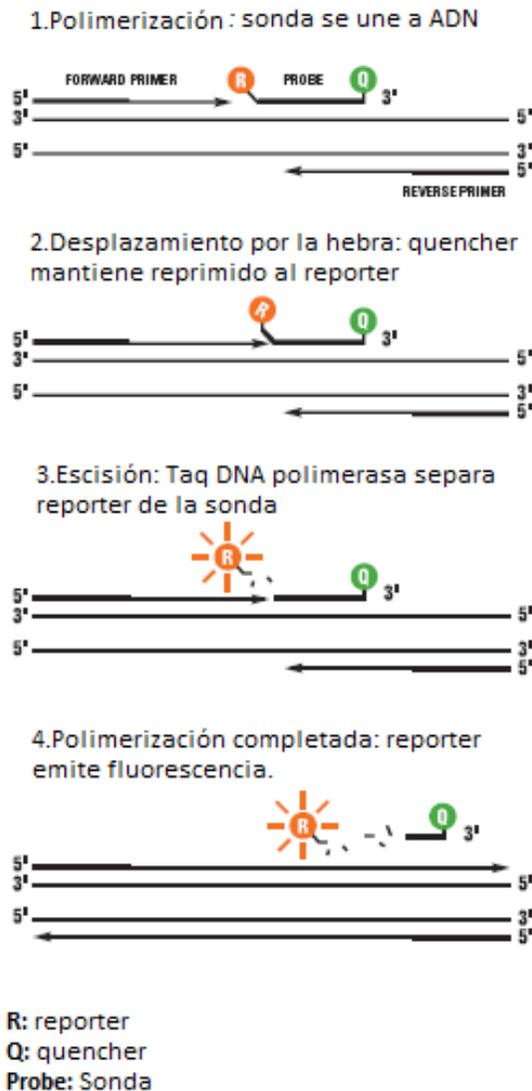


Ilustración 3: Principios del funcionamiento de las sondas Taqman (175)

En concreto, este ensayo se sirve de sondas Taqman[®]MGB, las cuales contienen un ligando de unión al surco menor (“*minor groove binder*”, MGB), lo cual permite la utilización de sondas más cortas en este tipo de ensayos. Esto se debe a que el MGB es capaz de formar un dúplex muy estable en el surco menor del ADN de tal forma que cuando la sonda Taqman[®] hibrida por

complementariedad de bases con el fragmento de ADN diana, este se une al surco menor formado entre ADN diana y sonda (bicatenario) estabilizando eficazmente esta hibridación.

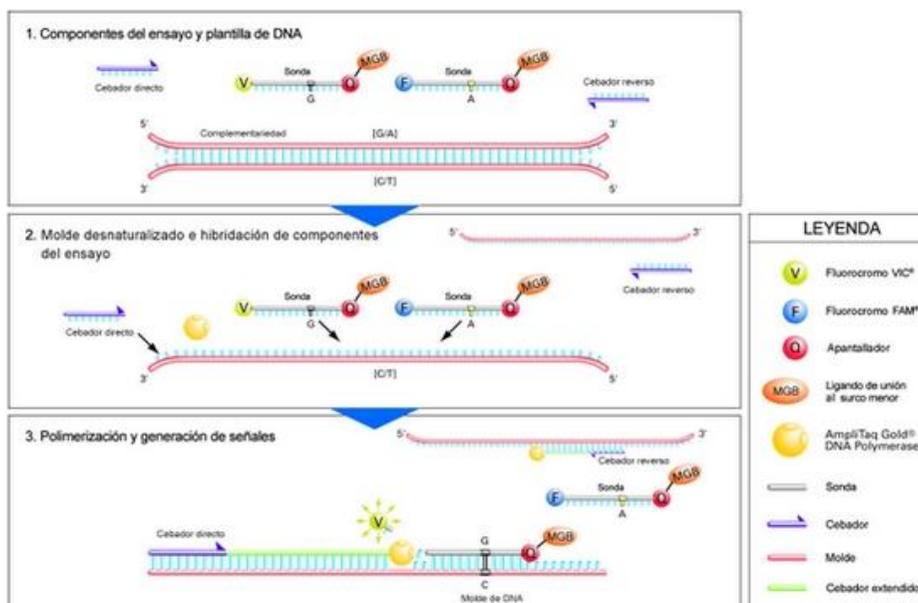


Ilustración 4: Principios del funcionamiento del genotipado de polimorfismos mediante el uso de sondas Taqman (176)

Para la lectura de la fluorescencia y por tanto, para la discriminación alélica y genotipado de las muestras se utilizó el sistema de detección *ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems* y el software de discriminación alélica 2.3 de *Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU)*.

Mediante este software, en función de la fluorescencia detectada, obtendremos un “plot” compuesto por puntos que representarán las diferentes muestras de ADN analizadas en una gráfica bidimensional (X, Y). El eje X representará la emisión de fluorescencia FAM® y por tanto indicará la presencia de un alelo determinado y el eje Y representará la emisión de fluorescencia VIC®, o lo que es lo mismo, la presencia del otro alelo posible.

MATERIAL Y MÉTODOS

De esta manera, los puntos cercanos a los ejes X e Y indicarán que el individuo es homocigoto (recesivo o dominante dependiendo que alelo representen el FAM y VIC) para ese polimorfismo, mientras, las muestras que emitan ambas fluorescencias aparecerán representadas como un punto en el centro del *plot*, lo cual significará que el individuo es heterocigoto para ese SNP.

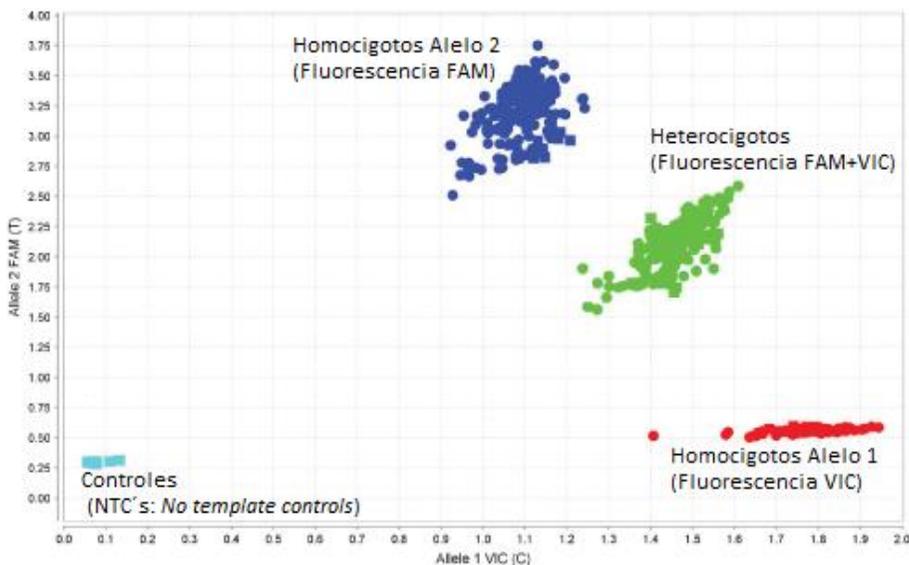


Ilustración 5: Representación gráfica de los resultados del genotipado por sondas Taqman ("*plot*")

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en ambos estudios se utilizó el paquete “*R commander (V.2.3-0)*” del programa “*R statistics (V.3.3.1)*”.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis descriptivo de las poblaciones incluidas en los 2 estudios realizados. Para esto, se calcularon las medias y desviaciones estándar (media \pm DS) de las variables cuantitativas estudiadas, y las frecuencias absolutas (n) y relativas (%) de cada una de las categorías en las que se dividieron las variables cualitativas. A continuación, se estudió la asociación entre las covariables y las variables dependientes (evento primario y eventos secundarios) e independientes (variables genéticas) de ambos estudios a fin de comprobar la posible influencia de todas las variables estudiadas sobre la respuesta, o su posible relación con los polimorfismos genéticos estudiados. De esta manera, controlamos la presencia de variables de confusión.

En este análisis bivariante, para comparar variables cualitativas se realizó el test de comparación de proporciones (χ^2 - Chi cuadrado). Si la frecuencia era <5 en $>20\%$ de las celdas de cada una de las tablas de contingencia construidas, se aplicó el test exacto de Fisher, y si esto ocurría en $<20\%$ de las celdas se utilizaría la corrección por continuidad de Yates, aunque esto no sucedió en ninguno de los casos.

Para las variables cuantitativas se aplicó el test T para muestras independientes, previa comprobación de la distribución normal de los grupos mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilks (177), y de la varianza, mediante el test de Levene (178).

Aquellas variables que en el análisis bivariante mostraron una asociación con la respuesta o los SNP con un valor de $p < 0.1$ se incluyeron en el modelo final o multivariante.

Tras esto, se estudió la influencia de la presencia de los polimorfismos *CYP2C19*2* o **17* o *ABCB1 C3435T* sobre la aparición del evento primario (objetivo primario) y secundarios (objetivo secundario).

Para esto, en primer lugar, se realizó un análisis bivalente mediante un test de hipótesis por tablas de contingencia (χ^2 - Chi cuadrado). Además, se llevó a cabo un análisis multivalente por regresión logística y el método “backward” en el que se incluyeron las variables que en el análisis bivalente previo mostraron una asociación con el genotipo o la respuesta con $p < 0.1$.

La respuesta al clopidogrel en función de los polimorfismos se evaluó mediante los *odds ratio* (OR) obtenidos, para los cuales se obtuvieron los intervalos de confianza al 95% (IC95%) y valores de p , siendo estadísticamente significativas las asociaciones con un valor de $p < 0.05$.

Se realizaron los siguientes estudios de asociación:

1. *CYP2C19* LOF frente el evento primario o secundarios.
2. *ABCB1* LOF frente el evento primario o secundarios.
3. LOF combinada: Portadores de un alelo *CYP2C19*2* o genotipo *ABCB1 3435TT* frente la aparición del evento primario o secundarios.
4. *CYP2C19* GOF frente el evento primario.

Por último, para estudiar el objetivo primario, además del análisis bivalente por chi cuadrado y el multivalente mediante regresión logística, se llevó a cabo un análisis del tiempo hasta el primer evento (supervivencia). Para esto, se utilizó el plugin “*RcmdrPlugin.UCA*” (V.3.1) de *R commander*. Las curvas de supervivencia se obtuvieron por Kaplan-Meier y la fórmula de Greenwood. Para la comparación de las curvas de supervivencia en función de los polimorfismos (variable independiente) se aplicó el modelo de regresión de Cox, y como contraste de hipótesis se utilizó el test logRank (Mantel-Haenszel), a partir del cual se obtuvieron el p -valor, Hazard Ratio

(HR) e IC95%. De nuevo, se consideraron estadísticamente significativas las asociaciones con un valor de $p < 0.05$.

5.1 METAANÁLISIS

El metaanálisis se llevó a cabo utilizando el paquete 'meta' de R.

La heterogeneidad de la muestra se estudió mediante el test Q y como estimación del efecto combinado de los resultados encontrados se utilizó el método de Mantel–Haenszel y un modelo de efecto fijo y aleatorio.

5.2 EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

El equilibrio de Hardy-Weinberg determina que: *“Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio que en loci autosómicos se alcanza tras una generación, siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones”* (179):

1. La población deber ser suficientemente grande y panmíctica (apareamiento aleatorio).
2. En la población no debe darse una reproducción ni una mortalidad diferencial, es decir, cada genotipo debe reproducirse o sobrevivir como cualquier otro.
3. La población no debe presentar flujo génico, es decir, no debe presentar una migración significativa.
4. No deben existir mutaciones en la población, a no ser que se presenten en sentido inverso y en la misma frecuencia.

Estas condiciones son complicadas de encontrar en la naturaleza, pero a pesar de esto, la mayoría de los genes se comportan dentro de límites estadísticamente aceptables con las condiciones de equilibrio entre dos generaciones sucesivas.

Por tanto, una población en estudio, en ausencia de sesgos debería

cumplir la ley de Hardy-Weinberg, y, por tanto, al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en la población de estudio con las frecuencias esperadas obtenidas a partir de una población de referencia, no deberíamos obtener diferencias significativas.

Para comprobar esto, se calcularon las frecuencias genotípicas de los polimorfismos *CYP2C19*2*, **3*, **17* y *ABCB1 C3435T* de los pacientes reclutados y se compararon con las frecuencias esperadas aplicando chi cuadrado o el test de Fisher. Este último, de nuevo en caso de que >20% de los grupos (celdas de las tablas de contingencia) presentara una frecuencia <5.

Como poblaciones de referencia (frecuencias esperadas) con las que comparar las frecuencias genotípicas de nuestra población se utilizaron:

1. Muestras aleatorias de la población en Granada que habían sido previamente almacenadas en GenYo como parte de otros proyectos de investigación.
2. Datos de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos *CYP2C19*2*, **3*, **17* y *ABCB1 3435C>T* en la población europea reclutada en el “1000 Genomes Project” (124), que se denominó “EUR_1000 Genomes Project”.
3. Datos de las frecuencias genotípicas y alélicas de estos polimorfismos, presentes en una subpoblación del “1000 Genomes Projects” que incluye únicamente individuos de la península ibérica (“IBS_1000 Genomes Project”).

Se consideró que había una diferencia estadísticamente significativa, y, por tanto, que la población estudiada no cumplía el Equilibrio de Hardy-Weinberg, si al comparar las frecuencias obtenidas y las esperadas se obtenían valores de $p < 0.05$.

6. ASPECTOS ÉTICOS Y DEONTOLÓGICOS

1. El estudio realizado con pacientes diagnosticados de EAP sometidos a ATP fue aprobado por el comité de ética de investigación de la provincia de Granada bajo el título:

“Evaluación preliminar de la influencia de la resistencia al clopidogrel en la evolución postimplante de stent por patología vascular periférica”.

2. El estudio realizado con pacientes diagnosticados de ictus o AIT también fue aprobado por el comité de ética de investigación de la provincia de Granada bajo el título:

“Impacto de los polimorfismos CYP2C19 y ABCB1 sobre la recurrencia de ictus en pacientes tratados con clopidogrel como terapia antiagregante para la prevención secundaria del ictus en la población andaluza”.

3. Ambos estudios se llevaron a cabo de acuerdo con las siguientes normas y declaraciones:

- Declaración de Helsinki (Revisión de Fortaleza, 2013) (180). Los principios recogidos en la declaración de Helsinki se respetaron durante todo el desarrollo del estudio, desde el reclutamiento, formato y comunicación del consentimiento informado del paciente para realizar el estudio, hasta el tratamiento de la información e interpretación de los resultados.
- Ley 14/2007 del 3 de Julio, de investigación biomédica.
- Orden ministerial SAS/3470/2009, por la que se publican las directrices sobre estudios de tipo observacional para medicamentos de uso humano.
- Ley Orgánica 15/2009, del 13 de diciembre, de protección de datos de

carácter personal.

4. Todas las muestras de saliva obtenidas de los pacientes reclutados y el ADN extraído a partir de estas muestras, de acuerdo con la ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011, se encuentran registradas en la sección de colecciones de muestras biológicas de origen humano del Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica, como una colección de muestras biológicas, con número de registro C.0004153, y con la Dra. Cristina Lucía Dávila Fajardo como responsable de la colección.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



RESULTADOS

RESULTADOS

1. ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA Y ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÁNEA

1.1 RECLUTAMIENTO

Tras la búsqueda inicial, se localizaron, 276 pacientes que, entre los años 2010 y 2013, habían sido diagnosticados de EAP y sometidos a una ATP, ya fuese con o sin implante de *stent*, en el Hospital Universitario San Cecilio en Granada (España).

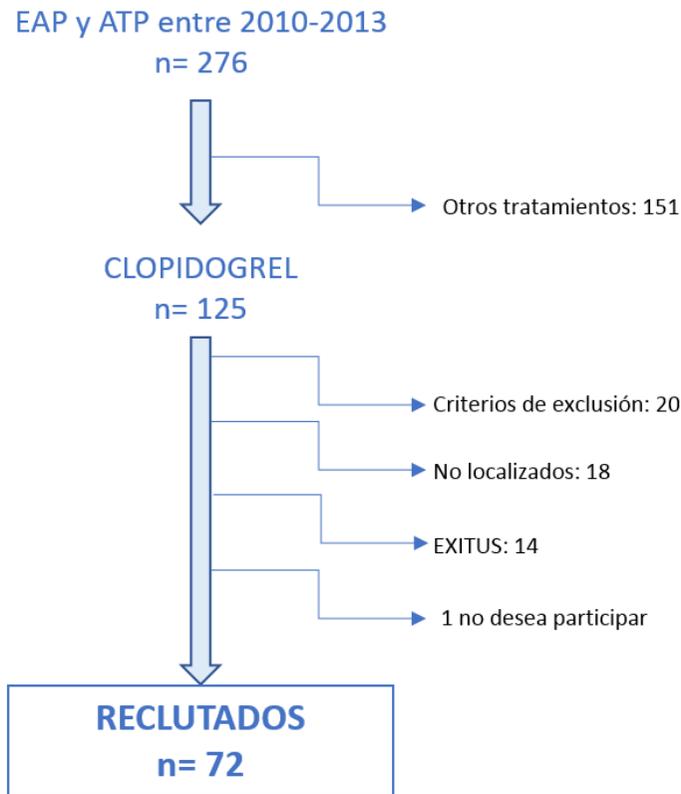


Figura 2: Pacientes reclutados con EAP

Entre estos, 125 pacientes habían sido tratados con clopidogrel desde la cirugía, como fármaco antiagregante para la prevención de eventos isquémicos secundarios a su patología.

Por tanto, estos 125 pacientes fueron los candidatos a la inclusión en el estudio, aunque, 14 de ellos ya habían fallecido en el momento del reclutamiento (2014), otros 20 cumplían alguno de los criterios de exclusión, 18 no pudieron ser localizados y 1 se negó a participar en el estudio.

De este modo, finalmente, 72 pacientes fueron incluidos en el estudio.

Todos los pacientes presentaban al menos un nivel IIb de Fontaine y la sintomatología habitual en casos de isquemia de miembros inferiores, antes de la intervención quirúrgica por la que se reclutaron. Esto es lógico si tenemos en cuenta que son criterios necesarios para una cirugía de este tipo.

1.2 CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN

Todas las variables clínicas, relativas al tratamiento farmacológico concomitante o a la cirugía quedan detalladas en las tablas 10 y 11, en las cuales, además, se evalúa la asociación de todas estas con las variables respuesta e independientes del estudio, como se explica en el punto 1.3 de los resultados: “ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE COVARIABLES Y POLIMORFISMOS”.

1.2.1 Variables clínicas.

Entre los 72 pacientes reclutados, 16 (22.2%) son mujeres, la edad media en el momento de la cirugía fue de 67.4 ± 9.4 años y el 100 % son caucásicos/as.

Por otro lado, si nos fijamos en los principales factores de riesgo de la enfermedad CV, observamos que, entre nuestros pacientes, en BL, 49 (68.1%) habían sido diagnosticados de diabetes, 52 (72.2%) de hipertensión, 37 (51.4%) tenían hipercolesterolemia y 48 (66.7%) habían sido fumadores. Además, 60 (83.3%) presentaron al menos 2 de estos factores de riesgo, 42 (55.5%) presentaron al menos 3 de estos factores de riesgo y más de la mitad (n=37; 51.4%) tenían antecedentes de enfermedad CV antes de ser reclutados

para este estudio: 16 (22.2%) habían sido diagnosticados con un SCA, 9 (12.5%) habían sufrido un ictus o AIT y 10 (13.8%) ya habían sido sometidos a una angioplastia de miembros inferiores.

1.2.2 Variables relacionadas con el tratamiento farmacológico.

Respecto a la duración del tratamiento con clopidogrel: la inmensa mayoría, 53 (73.6%), fueron tratados durante los 12 meses de seguimiento, 16 (22.2%) durante al menos 6 meses sin llegar a 12, y 3 (4.2%) durante al menos 3 meses sin llegar a 6; siempre después de la cirugía. Además, respecto al resto de medicamentos con efecto antiagregante o anticoagulante, 32 (44.4%) pacientes recibieron doble terapia antiagregante con AAS, 35 (48.6%) fueron tratados con heparinas, y 6 (8.3%) con cilostazol por presentar claudicación intermitente a pesar del éxito de la cirugía.

Es también importante señalar que, a pesar de que el 100% de los pacientes reclutados eran pluripatológicos y polimedcados, a 4 (5.5%) de ellos no se les prescribió ningún protector estomacal tras la cirugía ni durante el seguimiento, y a 11 (15.3%) se les prescribió omeprazol, a pesar del aviso de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), que desaconsejaba el uso concomitante de clopidogrel y omeprazol por el riesgo de disminución del efecto antiagregante del primero (181, 182), y que entre los años 2010 y 2013 estaba vigente. En total, a 26 (36.1%) se les prescribió algún IBP, entre los cuales, 15 (20.8% del total) eran distintos a omeprazol. El resto (n=42; 58.3%) recibieron ranitidina como protector estomacal.

1.2.3 Variables relacionadas con la cirugía.

Al alta de la cirugía y habiendo iniciado el tratamiento con clopidogrel (BL), solo 4 (5.5%) individuos fueron categorizados con un nivel III de Fontaine y ninguno en un nivel superior. Por otro lado, el valor medio del ITB en BL fue de 71.4 ± 25 y casi la mitad de los pacientes (n=35; 48.6%)

resolvieron los problemas de claudicación con la cirugía.

Además, de los 72 pacientes reclutados, a 49 (68.1%) se les implantó al menos un *stent* durante la cirugía y en 9 se utilizaron balones recubiertos de fármaco durante la ATP.

Por último, del total, en la mayoría (n=42; 58.3%) de los pacientes se intervino quirúrgicamente un único territorio vascular, y sólo en 1 (1.38%) paciente fue necesario intervenir los 3 territorios vasculares valorados en este estudio.

1.2.4 Variables genéticas

Entre los pacientes reclutados, se genotipo la presencia de los polimorfismos *CYP2C19*2*, **17*, *ABCB1 3435C>T* y, además, el *CYP2C19*3*, ya que, a pesar de no presentar una frecuencia >1% en caucásicos, sí se manifiesta significativamente en población africana, y debido a la influencia de la migración y mezcla de esta población con los países del sur de Europa, decidimos estudiar su presencia en nuestra población, la andaluza, que geográficamente es la más cercana a la población que más expresa este polimorfismo. El *CYP2C19*3*, al igual que el alelo **2* de este gen, ha sido asociado a una respuesta antiagregante deficiente de clopidogrel, y de estar presente en nuestra población, podría estar enmascarando falsos positivos respecto la variable respuesta y suponer una variable de confusión en este estudio.

Respecto al polimorfismo *CYP2C19*3*, ningún paciente reclutado era portador de esta variante. En lo que se refiere al *CYP2C19*2*, 18 (25%) individuos portaban esta variante (pacientes *CYP2C19* LOF), siendo solo 1 (1.4%) de ellos homocigoto recesivo (*CYP2C19*2/*2*), y el resto (n=17; 23.6%) heterocigotos (*CYP2C19*1/*2*). Por último, de acuerdo con el genotipo *ABCB1 3435 C>T*, 58 individuos (80.6%), fueron categorizados como *ABCB1* no-LOF, entre estos, 27 (37.5%) eran *ABCB1 3435CC* (Homocigotos

dominantes) y 31 (43.1%) *ABCB1 3435CT*, por lo que únicamente el 19.4% (n=14) eran homocigotos recesivos (*ABCB1 3435TT* o *ABCB1 LOF*) para este polimorfismo.

Todos los genotipos y frecuencias alélicas de las variantes genéticas estudiadas se encontraban en el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$) al compararlas con las poblaciones control, excepto el polimorfismo *ABCB1 C3435T* (Ver tabla 9), cuyas frecuencias genotípicas y alélicas mostraron una diferencia estadísticamente significativa al compararlas con la población europea incluida en el “1000 Genomes Project” (EUR_1000 Genomes Project).

Aunque, si comparamos las frecuencias alélicas y genotípicas de las 3 poblaciones control entre sí, la población europea muestra diferencias estadísticamente significativas respecto las frecuencias del *ABCB1 C3435T* comparado con la población originaria de la península ibérica incluida en el “1000 Genomes Project” (IBS_1000 Genomes Project) y con los controles aleatorios obtenidos de la población de Granada. Por esto, podemos afirmar que nuestra población se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg también para este polimorfismo, aunque, existe algún factor ambiental que esté condicionando un desequilibrio en su herencia al comparar la península ibérica con el resto de Europa.

POBLACIÓN	GENOTIPO Frecuencia (n)			p-valor	MAF Frecuencia (nº alelos)	p-valor
	HOM	HET	WT			
CYP2C19*2 (c.681G>A; rs4244285)						
Pacientes reclutados	0.014 (1)	0.236 (17)	0.750 (54)		0.132 (19)	
GRANADA	0.021 (4)	0.255 (49)	0.724 (139)	0.951*	0.148 (57)	0.631
IBS 1000	0	0.290 (31)	0.710 (76)	0.380*	0.145 (31)	0.730
EUR 1000	0.012 (6)	0.266 (134)	0.722 (363)	0.857	0.145 (146)	0.673
CYP2C19*3 (c.636G>A; rs4986893)						
Pacientes reclutados	0	0	1 (72)			
GRANADA	0	0	1 (192)	1	0 (0)	1
IBS 1000	0	0	1 (107)	1	0 (0)	1
EUR 1000	0	0	1 (503)	1	0 (0)	1
ABCBI C3435T (c.3435C>T; rs1045642)						
Pacientes reclutados	0.194 (14)	0.431 (31)	0.375 (27)		0.410 (59)	
GRANADA	0.214 (41)	0.427 (82)	0.359 (69)	0.938	0.427 (164)	0.719
IBS 1000	0.224 (24)	0.477 (51)	0.29 (32)	0.568	0.463 (99)	0.323
EUR 1000	0.266 (134)	0.503 (253)	0.231 (116)	0.027	0.518 (521)	0.018
CYP2C19*17 (c.-806C>T; rs12248560)						
Pacientes reclutados	0.014 (1)	0.347 (25)	0.639 (46)		0.361 (27)	
GRANADA	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
IBS 1000	0.037 (4)	0.355 (38)	0.607 (65)	0.766*	0.215 (46)	0.527
EUR 1000	0.044 (22)	0.360 (181)	0.596 (300)	0.538*	0.224 (225)	0.327

*Test de Fisher. En negrita y azul los valores de $p < 0.05$. HOM: Homocigotos recesivos; HET: Heterocigotos; WT: *wildtype* u homocigotos dominantes; MAF: *Minor Allele Frequency* (Frecuencia del alelo menor o "mutado"); Nd: No disponible.

Tabla 9: Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre los pacientes reclutados (EAP con ATP) y las poblaciones de referencia.

1.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE COVARIABLES Y POLIMORFISMOS/RESPUESTA

Se realizó un análisis bivalente valorando la posible asociación entre todas las variables incluidas en el estudio y las variables respuesta (evento primario; *ver tabla 11*) e independientes (genéticas; *ver tabla 10*).

De esta manera se trató de localizar aquellas características de los pacientes que por alguna razón pudieran estar relacionadas con las características genéticas, o que pudieran modificar la respuesta de los pacientes a la terapia antiagregante; de este modo, al incluirlas en el modelo multivalente podríamos saber la influencia real de los polimorfismos estudiados sobre la respuesta de los pacientes a clopidogrel.

Todas aquellas variables que en este análisis bivalente mostraron una asociación con el evento primario o las variables genéticas, con un valor de $p < 0.1$, se consideraron estadísticamente significativas para su inclusión en el modelo multivalente.

El *CYP2C19*2* mostró una asociación significativa ($p < 0.1$) con el sexo (mujeres, $p = 0.059$), con el diagnóstico de hipertensión ($p = 0.068$) y con el tratamiento concomitante con B-Bloqueantes durante el tiempo de seguimiento ($p = 0.042$).

El *ABCB1 3435C>T* se asoció significativamente con el consumo de heparinas ($p = 0.066$) durante el tiempo de seguimiento.

Además, al estudiar la asociación de las variables recogidas frente la pérdida de función del *CYP2C19* (*CYP2C19 LOF*) y *ABCB1* (*ABCB1 LOF*) combinadas, la enfermedad renal también mostró valores estadísticamente significativos ($p = 0.070$).

Al comparar la influencia de todas las covariables del estudio sobre el evento primario (eficacia o respuesta), el diagnóstico de hipertensión previo

al inicio del tratamiento con clopidogrel mostró un valor de $p=0.091$. Además, el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, concomitante a clopidogrel, se asoció con un mayor riesgo del evento primario (OR=2.83; IC95%= 1.03-7.79; $p=0.041$).

Las asociaciones con las variantes genéticas estudiadas pueden deberse al azar, ya que, si tenemos en cuenta la baja frecuencia de estas, el número de pacientes incluidos en el estudio, y el hecho de que no todos los pacientes expresan cada una de las variables, los grupos que conforman las tablas de contingencia para la realización de los test de Fisher y chi cuadrado quedan reducidos al máximo, y un leve desajuste en las frecuencias de cada grupo puede dar lugar a una significación estadística.

Respecto las variables asociadas a la respuesta, la hipertensión lo hace con un valor de $p=0.091$, suficiente para su consideración en el modelo multivariante pero no para considerar una influencia estadísticamente significativa según los criterios marcados para este estudio ($p<0.05$) sobre la respuesta.

En cambio, el tratamiento con IBP durante el tiempo de seguimiento, como hemos comentado, demostró un aumento del riesgo de sufrir el evento primario ($p=0.041$) entre los pacientes reclutados, que como sabemos, fueron tratados con clopidogrel. Como hemos visto, la AEMPS había emitido en 2010 un aviso alertando del riesgo de disminución del efecto antiagregante del clopidogrel en su uso combinado con omeprazol, lo cual podría explicar esta asociación. Actualmente sabemos que el pantoprazol también aumenta este riesgo de ineficacia del clopidogrel (183, 184) y entre los 26 pacientes de nuestro estudio que se les prescribió un IBP en BL, a 11 se les prescribió omeprazol y a 14 pantoprazol, lo cual reforzaría todavía más esta hipótesis.

RESULTADOS

VARIABLE	TOTAL	CYP2C19 y ABCB1 combinados		p-valor	CYP2C19*2		p-valor	ABCB1		p-valor
	n=72 n (%)	LOF n=31 n (%)	no-LOF n=41 n (%)		LOF n=18 n (%)	no-LOF n=54 n (%)		LOF n=14 n (%)	no-LOF n=58 n (%)	
Edad (media ± DS)	67.4 ± 9.4	67.1 ± 11	67.7 ± 8.6	0.775	67.6±11.1	67.3 ± 9.2	0.911	65.6±10.9	67.8 ± 9.4	0.482
Mujeres	16 (22.2)	9 (29)	7 (17)	0.227	7 (38.8)	9 (16.6)	0.059	2 (14.2)	14 (24.1)	0.426
Caucásicos	72 (100)	31 (100)	41 (100)	-	18 (100)	54 (100)	-	14 (100)	58 (100)	-
FACTORES DE RIESGO										
Diabetes	49 (68.1)	23 (74.1)	26 (63.4)	0.331	13 (72.2)	36 (66.6)	0.662	11 (78.5)	38 (65.5)	0.347
Hipertensión	52 (72.2)	19 (61.2)	33 (80.4)	0.076	10 (55.5)	42 (77.7)	0.068	10 (71.4)	42 (72.4)	0.941
Hipercolesterolemia	37 (51.4)	18 (58)	19 (46.3)	0.326	8 (44.4)	29 (53.7)	0.496	10 (71.4)	27 (46.5)	0.105
Tabaquismo	48 (66.7)	18 (58)	30 (73.1)	0.178	12 (66.6)	36 (66.6)	1	7 (50)	41 (70.6)	0.141
Enfermedad renal	12 (16.6)	8 (25.8)	4 (9.75)	0.070	7 (38.9)	5 (9.3)	0.011	2 (14.3)	10 (17.2)	1
Antecedentes CV	37 (51.4)	15 (48.4)	22 (53.7)	0.658	8 (44.4)	29 (53.7)	0.496	8 (57.1)	29 (50.0)	0.631
TRATAMIENTOS CONCOMITANTES DURANTE EL SEGUIMIENTO										
AAS	32 (44.4)	16 (51.6)	11 (26.8)	0.287	10 (55.5)	17 (31.4)	0.273	6 (42.8)	21 (36.2)	0.894
HBPM	35 (48.6)	20 (64.5)	15 (36.5)	0.019	10 (55.5)	25 (46.2)	0.496	10 (71.4)	25 (43.1)	0.066
Cilostazol	6 (8.3)	4 (12.9)	2 (4.8)	0.239	2 (11.1)	4 (7.4)	0.622	2 (14.2)	4 (6.8)	0.380
B-bloqueantes	23 (31.9)	6 (19.3)	17 (41.4)	0.046	2 (11.1)	21 (38.8)	0.042	4 (28.5)	21 (36.2)	0.763
IECA	26 (36.1)	10 (32.2)	16 (39)	0.554	6 (33.3)	20 (37)	0.777	4 (28.5)	22 (37.9)	0.513
ARAI	15 (20.8)	7 (22.5)	8 (19.5)	0.751	4 (22.2)	11 (20.3)	0.867	4 (28.5)	11 (18.9)	0.427
Estatinas	64 (88.8)	30 (96.7)	34 (82.9)	0.141	18 (100)	46 (85.1)	0.194	13 (92.8)	51 (87.9)	0.599
IBP	26 (36.1)	13 (41.9)	13 (31.7)	0.690	6 (33.3)	20 (37)	0.777	7 (50)	19 (32.7)	0.558
Anticoagulantes	0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Antecedentes CV: Antecedentes de enfermedad cardiovascular (Síndrome coronario agudo, ictus, accidente isquémico transitorio y enfermedad arterial periférica); AAS: Ácido Acetil Salicílico; HBPM: Heparinas de bajo peso molecular; IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARAII: Antagonistas de los receptores de la angiotensina II; IBP: Inhibidores de la bomba de protones. / En azul lo valores de p<0.1

Tabla 10: Características basales de la población (EAP) y su relación con los polimorfismos estudiados

Tabla 10 (Continuación): Características basales de la población (EAP) y su relación con los polimorfismos estudiados

VARIABLE	TOTAL	CYP2C19 y ABCB1 combinados		p-valor	CYP2C19*2		p-valor	ABCB1		p-valor
	n=72	LOF n=31	no-LOF n=41		LOF n=18	no-LOF n=54		LOF n=14	no-LOF n=58	
VARIABLES QUIRÚRGICAS Y RELACIONADAS CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD (BASELINE)										
Clasificación de Fontaine	0.699			0.999			0.731			
1 (ref.)	6 (8.3)	0 (0)	6 (14.6)		0 (0)	6 (11.1)		0 (0)	6 (10.3)	
2A	36 (50)	19 (61.2)	17 (41.4)		10 (55.5)	26 (48.1)		10 (71.4)	26 (44.8)	
2B	26 (36.1)	11 (35.4)	15 (36.5)		7 (38.8)	19 (35.1)		4 (28.5)	22 (37.9)	
3	4 (5.5)	1 (3.2)	3 (7.3)		1 (5.5)	3 (5.5)		0 (0)	4 (6.8)	
PVR	0.116			0.380			0.664			
1 (ref.)	13 (18.1)	3 (9.6)	10 (24.3)		3 (16.6)	10 (18.5)		0 (0)	13 (22.4)	
2	25(34.7)	15 (48.3)	10 (24.3)		9 (50)	16 (29.6)		7 (50)	18 (31)	
3	13 (18.1)	6 (19.3)	7 (17)		2 (11.1)	11 (20.3)		4 (28.5)	9 (16.6)	
Sin datos	21 (29.2)	7 (22.5)	14 (34.1)		4 (22.2)	17 (31.4)		3 (21.4)	18 (31)	
Distancia de claudicación	0.774			0.688			0.789			
No claudicación (ref.)	35 (48.6)	17 (54.8)	18 (43.9)		10 (55.5)	25 (46.2)		7 (50)	28 (48.2)	
>500 m	4 (5.6)	0 (0)	4 (9.7)		0 (0)	4 (7.4)		0 (0)	4 (6.8)	
>150 m	10(13.9)	3 (9.6)	7 (17)		1 (5.5)	9 (16.6)		2 (14.2)	8 (13.6)	
<150	23 (31.9)	11 (35.4)	12 (29.2)		7 (38.8)	16 (29.6)		5 (35.7)	18 (31)	
ITB (media ± DS)	71.4 ± 25	66.2 ± 22.7	76.5 ± 26.6	0.159	65.1 ± 22.2	73.9 ± 25.9	0.274	68.5 ± 23.3	72.2 ± 25.7	0.666
Número de regiones tratadas	0.936			0.837			0.793			
1 (ref.)	42 (58.3)	17 (54.8)	25 (60.9)		9 (50)	33 (61.1)		8 (57.1)	34 (58.6)	
2	29 (40.2)	13 (18.05)	16 (39.02)		8 (44.4)	21 (38.8)		6 (42.8)	23 (39.6)	
3	1 (1.38)	1 (3.2)	0 (0)		1 (5)	0 (0)		0 (0)	1 (1.7)	
Balón recubierto	9 (12.5)	4 (12.9)	5 (12.1)	0.928	3 (16.6)	6 (11.1)	0.540	1 (7.1)	8 (13.7)	0.508
Stent	49 (68.05)	20 (64.5)	29 (70.7)	0.576	10 (55.5)	39 (72.2)	0.194	10 (71.4)	39 (67.3)	0.763

PVR: Pulse volumen record (pletismografía); ITB: Índice tobillo-brazo; DS: Desviación estándar; REF: Valor de referencia para test t de student

RESULTADOS

VARIABLE	TOTAL n=72 n (%)	Evento primario n (%)		OR (IC 95%) p-valor
		SI n=25	NO n=47	
Edad (media±DS)	67.4 ± 9.4	67.2 ± 9.5	67.5 ± 9.8	0.99 (0.94-1.05) p=0.897
Mujeres	16 (22.2)	6 (24)	10 (21.7)	1.17 (0.37-3.70) p=0.791
Caucásicos	72 (100)	25 (100)	47 (100)	-
FACTORES DE RIESGO				
Diabetes	49 (68.1)	19 (76)	30 (63.8)	1.66 (0.57-4.81) p=0.292
Hipertensión	52 (72.2)	15 (60)	37 (78.7)	0.40 (0.14-1.17) p=0.091
Hipercolesterolemia	37 (51.4)	11 (44)	26 (55.3)	0.63 (0.23-1.68) p=0.360
Tabaquismo	48 (66.7)	15 (60)	33 (70.2)	0.63 (0.23-1.75) p=0.381
Enfermedad renal	12 (16.6)	5 (20)	7 (14.9)	1.43 (0.40-5.07) p=0.581
Antecedentes CV	37 (51.4)	14 (56.0)	23 (48.9)	1.33 (0.50-3.52) p=0.568
TRATAMIENTOS CONCOMITANTES DURANTE EL SEGUIMIENTO				
AAS	32 (44.4)	11 (44)	21 (44.6)	0.97 (0.36-2.58) p=0.956
HBPM	35 (48.6)	14 (56)	21 (44.6)	1.57 (0.59-4.18) p=0.360
Cilostazol	6 (8.3)	1 (4)	5 (10.6)	0.35 (0.39-3.17) p=0.332
B-bloqueantes	23 (31.9)	7 (28)	16 (34.0)	0.75 (0.26-2.17) p=0.601
IECA	26 (36.1)	9 (36)	17 (36.1)	0.99 (0.36-2.76) p=0.989
ARAI	15 (20.8)	7 (28)	8 (17.2)	1.89 (0.59-6.03) p=0.275
Estatinas	64 (88.9)	22 (88)	42 (89.3)	0.87 (0.19-3.99) p=0.861
IBP	26 (36.1)	13 (52)	13 (27.6)	2.83 (1.03-7.79) p=0.041
Anticoagulantes	0 (0)	-	-	-
VARIABLES QUIRÚRGICAS Y RELACIONADAS CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD (BASELINE)				
Clasificación de Fontaine				0.114
1 (ref.)	6 (8.3)	0 (0)	6 (2.1)	
2A	36 (50)	9 (36)	27 (57.4)	
2B	26 (36.1)	13 (52)	13 (27.6)	
3	4 (5.5)	3 (12)	1 (2.1)	
PVR				0.106
1 (ref.)	13 (18.1)	2 (8)	11 (23.4)	
2	25(34.7)	13 (52)	12 (25.5)	
3	13 (18.1)	4 (16)	9 (19.1)	
No data	21 (29.2)	6 (24)	15 (31.9)	
Distancia de claudicación				0.264
No claudicación (ref.)	35 (48.6)	12 (48)	23 (48.9)	
>500 m	4 (5.6)	1 (4)	3 (6.3)	
>150 m	10(13.9)	1 (4)	9 (18.9)	
<150 m	23 (31.9)	11 (44)	12 (25.5)	
Número de regiones tratadas				0.924
1 (ref.)	42 (58.3)	14 (56)	28 (59.5)	
2	29 (40.2)	11 (44)	18 (38.2)	
3	1 (1.38)	0 (0)	1 (2.1)	
ITB (media ± DS)	71.4 ± 25.0	68.4 ± 22.3	73.4 ± 26.9	0.99 (0.96-1.02) p=0.497
Balón recubierto	9 (12.5)	5 (20)	4 (8.5)	0.37 (0.09-1.53) p=0.172
Stent	49 (68.05)	14 (56)	35 (74.4)	2.29 (0.82-6.39) p=0.113

Tabla 11: Características basales de la población (EAP) y relación con el evento primario

1.4 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EVENTO PRIMARIO Y POLIMORFISMOS (OBJETIVO PRIMARIO)

La respuesta clínica o eficacia del clopidogrel se comparó de acuerdo con la aparición del evento primario, entendiendo como tal, la aparición de una re-estenosis u oclusión del vaso intervenido durante la cirugía (ATP de miembros inferiores).

Se estudió la influencia sobre la eficacia en función de la presencia, independiente o combinada, de los polimorfismos *CYP2C19*2* y *ABCB1 C3435T*. Además, los resultados se ajustaron en un modelo multivariante (*Ver tabla 12*), que incluyó las variables que en el análisis bivariante previo mostraron una asociación con la respuesta y/o los polimorfismos, con valores de $p < 0.1$.

De acuerdo con el genotipo *CYP2C19*2*, los pacientes portadores de este polimorfismo (*CYP2C19 LOF*) mostraron un mayor riesgo de sufrir el evento primario que los no portadores (*CYP2C19*1/*1* o no *LOF*) ($OR=4.49$; $IC\ 95\%=1.45-13.84$; $p=0.009$). Esta asociación se mantuvo al incluir las variables hipertensión, uso concomitante de IBP, género (mujeres) y uso concomitante de B-bloqueantes en un modelo multivariante ($OR=4.89$; $IC\ 95\%=1.32-12.83$; $p=0.018$).

Respecto al polimorfismo *ABCB1 C3435T*, el genotipo *ABCB1 3435TT* (*ABCB1 LOF*) no se relacionó significativamente con un aumento del riesgo de sufrir el evento primario, ni en el análisis crudo ($OR=2.22$; $IC\ 95\%=0.67-7.27$; $p=0.187$), ni en el multivariante, habiéndose ajustado el modelo por el diagnóstico de hipertensión previo al inicio del tratamiento y el uso concomitante de IBP y HBPM ($OR=2.98$; $IC\ 95\%=0.75-11.86$; $p=0.12$).

El efecto combinado de ambos polimorfismos sobre la respuesta indicó que, los pacientes portadores de al menos un alelo *CYP2C19*2* y/o un genotipo *ABCB1 TT* tienen un riesgo significativamente mayor de sufrir el

evento primario que los no portadores de estas variantes (OR=5.00; IC 95%=1.75-14.27; p=0.003), lo cual se confirmó al incluir las variables hipertensión, enfermedad renal uso concomitante de IBP, B-bloqueantes y HBPM durante el tratamiento en el modelo multivariante (OR=4.66; IC 95%=1.37-15.84; p=0.014).

El *CYP2C19*17* está relacionado con un aumento de la expresión de la enzima y, por tanto, con un aumento en la función del CYP2C19. Así, de influir en la respuesta, tendría un efecto contrario al provocado por los polimorfismos LOF. La presencia del *CYP2C19*17* no se asoció, en pacientes con EAP sometidos a ATP, con ninguna de las características de los pacientes en el análisis bivariante, y tampoco se encontró que este polimorfismo influyera en la respuesta antiagregante al clopidogrel (OR=0.76; IC 95%=0.28-2.12; p=0.596) (*Ver tabla 12*).

	EVENTO PRIMARIO		OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)*	p-valor*	OR (IC 95%)^	p-valor^
	SI (n=25, 34.7%)	NO (n=47, 66.3%)						
CYP2C19 LOF	11 (44%)	7 (15%)	4.49 (1.45-13.84)	0.009	4.89 (1.32-12.83) ^a	0.018^a	6.16 (1.81-21)	0.003
CYP2C19 no-LOF	14 (56%)	40 (85%)						
ABCB1 LOF	7 (28%)	7 (15%)	2.22 (0.67-7.27)	0.187	2.98 (0.75-11.86) ^b	0.120 ^b	3.82 (1.04-14.06)	0.043
ABCB1 no-LOF	18 (72%)	40 (85%)						
CYP2C19 GOF	8 (32%)	18 (38%)	0.76 (0.27-2.11)	0.596	-	-	0.91 (0.30-2.79)	0.868
CYP2C19 no-GOF	17 (68%)	29 (62%)						
LOF combinado	17 (68%)	14 (30%)	5.00 (1.75-14.27)	0.003	4.66 (1.37-15.84) ^c	0.014^c	-	-
no-LOF combinado	8 (32%)	33 (70%)						

*Ajustado por: ^a HTA, IBP, sexo, B-bloqueantes; ^b HTA, IBP, HBPM; ^c HTA, IBP, HBPM, B-bloqueantes, enfermedad renal.

^ Ajustado por el resto de los polimorfismos.

En azul los p-valor<0.05

Tabla 12: Asociación entre polimorfismos y el evento primario (chi cuadrado) en pacientes con EAP

ABCB1 LOF + CYP2C19 LOF		CYP2C19 LOF		ABCB1 LOF		CYP2C19 GOF	
HR (IC 95%)	p-valor	HR (IC 95%)	p-valor	HR (IC 95%)	p-valor	HR (IC 95%)	p-valor
4.21 (1.74 – 10.17)	<0.001	4.07 (1.80 – 9.20)	<0.001	1.70 (0.71 – 4.11)	0.231	0.69 (0.30-1.61)	0.394

Tabla 13: Asociación entre polimorfismos y el evento primario (Cox) en pacientes con EAP

Además, si analizamos la influencia del *CYP2C19*2*, **17* y *ABCB1 C3435T* frente la respuesta mediante una regresión logística en un modelo multivariante a fin de comprobar el peso que tiene cada polimorfismo sobre la aparición del evento primario, observamos que *ABCB1 LOF* consigue un valor de $p < 0.05$ (OR=3.82; IC 95%=1.04-14.06; $p=0.043$), *CYP2C19 LOF* mantiene esta significación estadística (OR= 6.16; IC 95%=1.81-21; $p=0.003$) y *CYP2C19 GOF* sigue sin asociarse a la respuesta ($p=0.868$).

Al analizar la supervivencia del evento primario en función de los polimorfismos se confirman los resultados obtenidos por chi cuadrado (Ver *tabla 13*). De este modo, la presencia del *CYP2C19*2* se asoció con un aumento de la tasa del riesgo de sufrir un evento primario (HR=4.07; IC 95%=1.80 – 9.20; $p < 0.001$), al igual que sucede con la combinada de *CYP2C19 LOF* y *ABCB1 LOF* (HR=4.21; IC 95%=1.74 – 10.17; $p < 0.001$), y al contrario que el genotipo *ABCB1 3435TT* (*ABCB1 LOF*) (HR=1.70; IC 95%=0.71 – 4.11; $p=0.231$) y la presencia de *CYP2C19*17* (*CYP2C19 GOF*) (HR=0.69; IC 95%=0.30-1.61; $p=0.394$), que no se asociaron estadísticamente con la respuesta en este análisis.

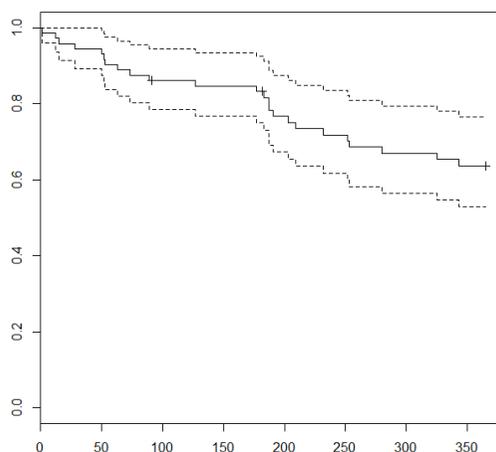


Figura 3: Curva de supervivencia (censura: evento isquémico) en EAP

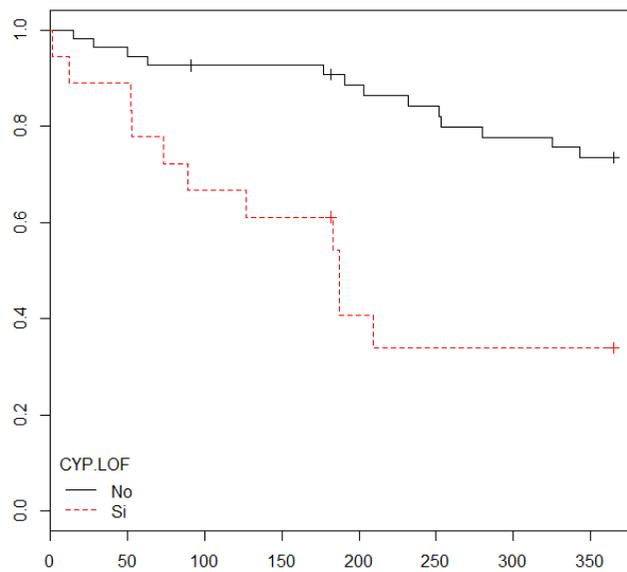


Figura 4: Curva de supervivencia en función de CYP2C19 LOF en EAP

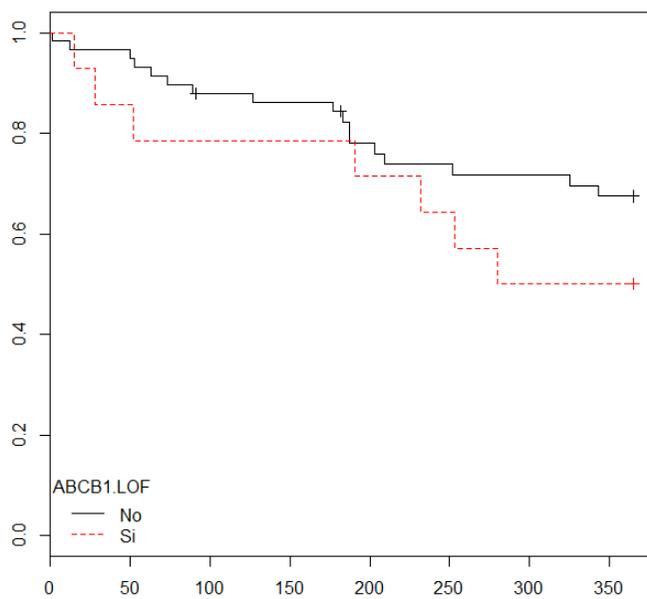


Figura 5: Curva de supervivencia en función de ABCB1 LOF en EAP

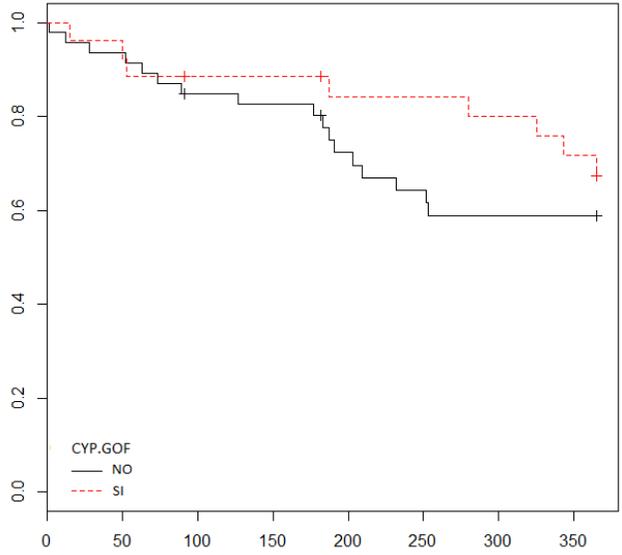


Figura 6: Curva de supervivencia en función de CYP2C19 GOF en EAP

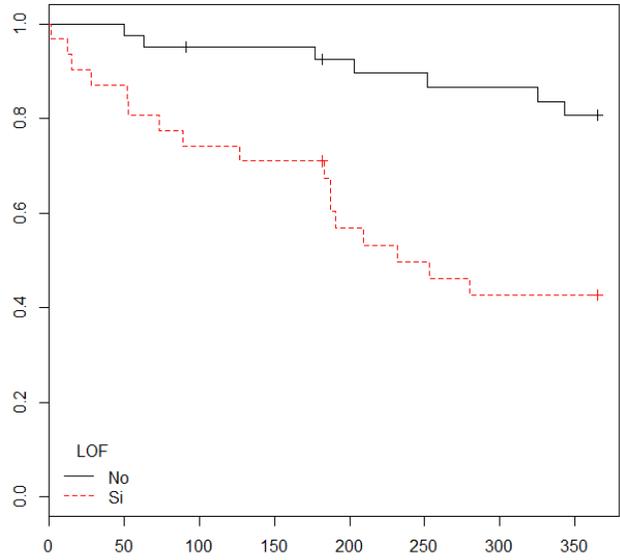


Figura 7: Curva de supervivencia en función de LOF combinado (CYP2C19+ABCB1) en EAP

1.5 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EVENTOS SECUNDARIOS Y POLIMORFISMOS (OBJETIVO SECUNDARIO)

Como objetivo secundario del estudio en pacientes con EAP, se evaluó la asociación entre los polimorfismos y las principales variables clínicas utilizadas en la caracterización de la evolución de los pacientes con esta enfermedad.

Los alelos LOF combinados se asociaron con una mala evolución del PVR (OR=4.35; IC 95%= 1.14-16.49; p=0.031) y con una mala evolución de la distancia de claudicación (OR=6.28; IC 95%= 1.60-24.56; p=0.008).

El CYP2C19*2 se asoció de manera independiente con la mala evolución de los pacientes, al comparar su estatus relativo a la clasificación de Fontaine al alta con la valoración hecha en 4 momentos durante 12 meses (OR=8.31; IC 95%=2.37-29.17; p=0.001); además, la presencia de este polimorfismo se asoció con una mala evolución de la distancia de claudicación (OR= 6.22; IC 95%= 1.31-29.44; p=0.021). La evolución del ITB no se asoció con ninguno de los polimorfismos (Ver Tabla 14). Tampoco en este caso, la presencia de CYP2C19*17 se asoció con ninguno de los eventos secundarios.

EVENTO SECUNDARIO (mala evolución)	CYP2C19*2 + ABCB1 TT		CYP2C19*2 LOF		ABCB1 LOF	
	OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p-valor
Clasificación de Fontaine	13.96 (4.44-43.80)	<0.001	8.31 (2.36-29.16)	0.001	4.75 (1.32-17.07)	0.017
Índice tobillo-brazo	2.75 (0.64-11.69)	0.171	2.16 (0.48-9.64)	0.310	1.87 (0.29-12.14)	0.510
PVR	4.35 (1.14-16.49)	0.031	2.91 (0.79-10.67)	0.106	3.46 (0.77-15.55)	0.109
Distancia de claudicación	6.28 (1.60-24.56)	0.008	6.22 (1.31-29.44)	0.021	1.91 (0.40-9.04)	0.410

En azul los p valor<0.05

Tabla 14: Asociación entre polimorfismos y variables clínicas de evolución (objetivo secundario)

1.6 METAANÁLISIS EN PACIENTES CON EAP SOMETIDOS A ATP

Únicamente se encontró un estudio publicado en una revista impacto que evaluara la influencia de los polimorfismos *CYP2C19* o *ABCB1* en la respuesta a clopidogrel en pacientes con EAP.

En este artículo, publicado por Guo *et al.* (150), se estudió la influencia del *SNP CYP2C19*2* de manera independiente sobre la eficacia del clopidogrel en pacientes con EAP. Los pacientes incluidos en este estudio presentaban una estenosis de la arteria femoral que necesitó ser recanalizada quirúrgicamente y que presentó un buen resultado angiográfico al alta de la cirugía. Consideraron como evento primario la re-estenosis del territorio intervenido (evento isquémico), además recogieron datos sobre la necesidad de reintervención quirúrgica y de amputación del miembro intervenido. El estudio se realizó en una cohorte de 50 pacientes asiáticos con un seguimiento de 12 meses después de la cirugía.

Nuestros resultados se mostraron similares a los obtenidos por Guo *et al.* al estudiar la asociación del *CYP2C19*2* y la aparición de un evento isquémico y reintervención quirúrgica. Aunque, en este estudio la proporción de pacientes portadores del alelo *CYP2C19*2* es significativamente mayor que en el nuestro, esto se debe a que los pacientes son de origen asiático y en Asia, el porcentaje de individuos portadores de *CYP2C19*2* es mayor que en caucásicos (185).

Para la realización del metaanálisis combinamos nuestros resultados con los obtenidos en este estudio, sumando una cohorte total de n=122 pacientes.

El test Q indicó que no existía heterogeneidad entre ambos estudios para la aparición de eventos isquémicos ($p=0.63$), ni tampoco para la necesidad de re-operación del miembro afectado ($p=0.28$).

En el estudio combinado de ambos trabajos, la presencia del *CYP2C19*2*

se relacionó con un aumento del riesgo de sufrir el evento primario (evento isquémico) (Ver figura 8) comparado con los no portadores *CYP2C19*2* (OR=5.40; IC 95%=2.30-12.70). Sin embargo, la presencia del alelo *CYP2C19*2* no se asoció con un aumento del riesgo de re-operación del miembro afectado (Ver figura 9).

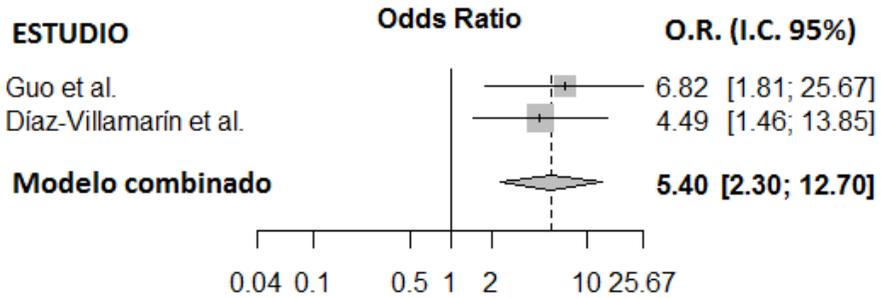


Figura 8: Análisis combinado en pacientes con EAP: Forest plot que indica O.R. e I.C.95% de la asociación del *CYP2C19*2* y evento isquémico

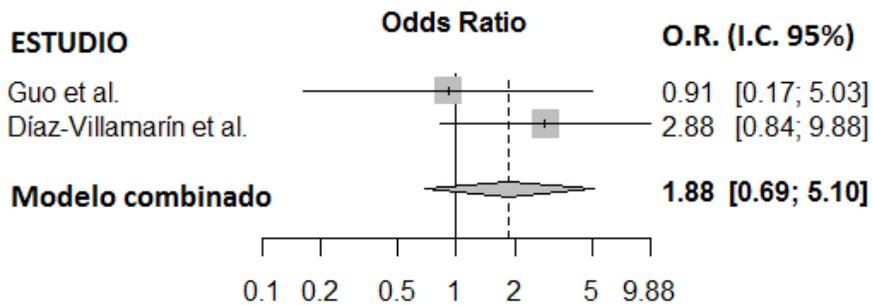


Figura 9: Análisis combinado en pacientes con EAP: Forest plot que indica O.R. e I.C.95% de la asociación del *CYP2C19*2* y necesidad de re-operación en el miembro afectado

2. ICTUS O ACCIDENTE ISQUÉMICO TRANSITORIO

2.1 RECLUTAMIENTO

Tras la búsqueda inicial, el servicio de documentación clínica proporcionó el NUHSA de los pacientes que habían sido diagnosticados de ictus o AIT y que habían sido hospitalizados por esta razón en el servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario San Cecilio en Granada (España) entre los años 2010 y 2013 (incluidos).

Se localizaron 395 pacientes, de los cuales, 114 fueron tratados con clopidogrel desde el diagnóstico durante al menos 1 mes y no necesitaron terapia anticoagulante.

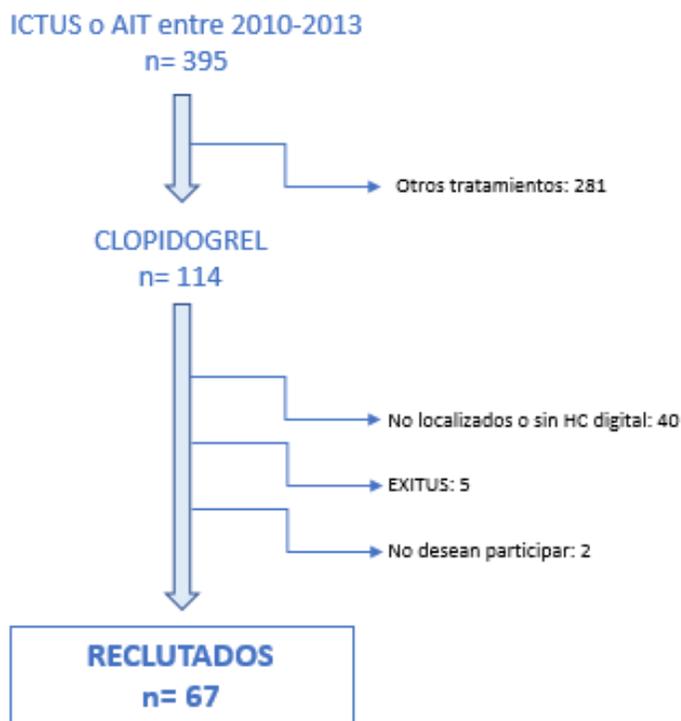


Figura 10: Pacientes reclutados con ictus o AIT

Entre estos 114 pacientes que cumplían los criterios de inclusión y no cumplían los de exclusión, 5 habían fallecido y 40 no pudieron ser localizados en el momento del reclutamiento o no tenían datos en su historia clínica digitalizada, además, 2 pacientes no dieron su consentimiento para participar en el estudio.

De este modo, finalmente se reclutaron 67 pacientes tratados con clopidogrel, tras haber sufrido un ictus o AIT, entre los años 2010 y 2013 y que necesitaron ser hospitalizados por esta razón, entre estos, solo 14 fueron reclutados por AIT mientras que la mayoría (n=53; 79.1%) fueron reclutados por haber padecido un ictus.

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

Todas las variables clínicas, factores de riesgo o variables referidas al tratamiento concomitante a clopidogrel desde el diagnóstico de ictus/AIT, quedan detalladas en las tablas 16 y 17, en las cuales, además, se evalúa la asociación de todas estas con las variables respuesta e independiente del estudio, como se explica en el punto 2.3 de los resultados: “ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE COVARIABLES Y POLIMORFISMOS/RESPUESTA”.

2.2.1 Variables clínicas y factores de riesgo

Entre los 67 pacientes reclutados, 24 (35.8%) son mujeres, la edad media fue de 68.2 ± 9.8 años y el 100 % eran caucásicos.

Por otro lado, si nos fijamos en los principales factores de riesgo de la enfermedad CV, observamos que, entre nuestros pacientes, en el momento del inicio del tratamiento con clopidogrel tras el diagnóstico, 28 (41.8%) habían sido diagnosticados de diabetes, 53 (79.1%) de hipertensión, 48 (71.6%) tenían hipercolesterolemia y 11 (16.4%) eran fumadores.

Por otro lado, 28 (41.8%) tenían antecedentes de ECV (ictus y/o AIT) y 22 (32.8%) de enfermedad cardiológica. Además, 9 de los individuos reclutados

(13.4%) habían sido sometidos a cirugía de carótida con implante de *stent*.

2.2.2 Variables relacionadas con el tratamiento farmacológico.

Respecto al tratamiento con clopidogrel, todos los pacientes reclutados recibieron tratamiento antiagregante indefinido y confirmamos que todos cumplieron mínimo un mes de tratamiento. Además, respecto a los tratamientos antiagregantes previos y durante el seguimiento, 48 (71.6%) pacientes ya tomaban alguno antes del diagnóstico de ictus por el que fueron reclutados para este estudio, entre estos, 17 (25.4%) estaban siendo tratados con AAS y 8 (11.9%) con clopidogrel. Desde el diagnóstico, 20 (29.9%) pacientes recibieron doble terapia antiagregante con AAS.

Respecto al resto de medicación concomitante a clopidogrel y que los pacientes tomaban al menos desde el diagnóstico de ictus y antes del alta hospitalaria (BL), cabe destacar que 52 (77.61%) pacientes recibieron tratamiento con estatinas, 26 (38.8%) IECA, 20 (29.9%) con ARAII y 15 (22.4%) fueron tratados con antagonistas del calcio.

Además, como ya destacamos en el estudio con pacientes con EAP, entre los pacientes con ictus /AIT, 30 (44.8%) fueron tratados con IBP de manera concomitante a clopidogrel, a pesar del aviso de la AEMPS desaconsejando el uso simultáneo de clopidogrel y omeprazol o esomeprazol.

2.2.3 Variables genéticas

Entre los pacientes reclutados, al igual que entre los pacientes con EAP, se genotiparon los SNP *CYP2C19*2*, **3*, **17*, *ABCB1 3435C>T*. Respecto al SNP *CYP2C19*3*, ningún paciente reclutado era portador de esta variante. Respecto al *CYP2C19*2*, 18 (26.9%) individuos portaban esta variante (pacientes *CYP2C19* LOF), entre los cuales, solo 3 (4.5%) de ellos eran homocigotos recesivos (*CYP2C19*2/*2*), y el resto (n=15; 22.4%) heterocigotos (*CYP2C19*1/*2*).

POBLACIÓN	GENOTIPO Frecuencia (n)			p-valor	MAF Frecuencia (nº alelos)	p-valor
	HOM	HET	WT			
CYP2C19*2 (c.681G>A; rs4244285)						
Pacientes reclutados	0.045 (3)	0.224 (15)	0.731 (49)		0.157 (21)	
GRANADA	0.021 (4)	0.255 (49)	0.724 (139)	0.532*	0.148 (57)	0.818
IBS 1000	0	0.290 (31)	0.710 (76)	0.073*	0.145 (31)	0.763
EUR 1000	0.012 (6)	0.266 (134)	0.722 (363)	0.107	0.145 (146)	0.722
CYP2C19*3 (c.636G>A; rs4986893)						
Pacientes reclutados	0	0	1 (72)		0 (0)	
GRANADA	0	0	1 (192)	1	0 (0)	1
IBS 1000	0	0	1 (107)	1	0 (0)	1
EUR 1000	0	0	1 (503)	1	0 (0)	1
ABCB1 C3435T (c.3435C>T; rs1045642)						
Pacientes reclutados	0.164 (11)	0.433 (29)	0.403 (27)		0.381 (51)	
GRANADA	0.214 (41)	0.427 (82)	0.359 (69)	0.650	0.427 (164)	0.347
IBS 1000	0.224 (24)	0.477 (51)	0.29 (32)	0.328	0.463 (99)	0.133
EUR 1000	0.266 (134)	0.503 (253)	0.231 (116)	0.007	0.518 (521)	0.002
CYP2C19*17 (c.-806C>T; rs12248560)						
Pacientes reclutados	0.075 (5)	0.284 (19)	0.642 (43)		0.216 (29)	
GRANADA	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
IBS 1000	0.037 (4)	0.355 (38)	0.607 (65)	0.381*	0.215 (46)	0.974
EUR 1000	0.044 (22)	0.360 (181)	0.596 (300)	0.301	0.224 (225)	0.850

*Test de Fisher. En negrita y azul los valores de $p < 0.05$. HOM: Homocigotos recesivos; HET: Heterocigotos; WT: *wildtype* u homocigotos dominantes; MAF: *Minor Allele Frequency* (Frecuencia del alelo menor o mutado); Nd: No determinado.

Tabla 15: Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas entre los pacientes reclutados (ictus/AIT) y las poblaciones de referencia

De acuerdo con el genotipo *ABCB1 3435 C>T*, 56 pacientes (83.6%), fueron categorizados como *ABCB1* no-LOF, de los cuales, 27 (40.3%) eran *ABCB1 3435CC* (Homocigotos dominantes) y 29 (43.3%) *ABCB1 3435CT*. Así, solo el 16.4% (n=11) eran homocigotos recesivos (*ABCB1 3435TT* o *ABCB1* LOF).

Todos los genotipos y frecuencias alélicas de las variantes genéticas estudiadas se encontraban en el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p>0.05$) al compararlas con las poblaciones control. Excepto, el *ABCB1 C3435T*, que al igual que en la cohorte de pacientes con EAP, muestra diferencias significativas al comparar sus frecuencias entre la población europea con la de la península ibérica, los controles de Granada, y la reclutada en nuestro estudio. Esto apoya la hipótesis antes expuesta, de que existe un desequilibrio en la herencia del SNP *ABCB1 3535C>T* entre la población peninsular y el resto de Europa.

Las características genéticas de nuestra población y las comparaciones de las frecuencias genotípicas y alélicas con las poblaciones control se detallan en la tabla 15.

2.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE COVARIABLES Y POLIMORFISMOS/RESPUESTA

Al igual que en el estudio en pacientes con EAP, se realizó un análisis bivalente evaluando la posible asociación entre todas las variables incluidas en el estudio y las variables respuesta (evento primario; *ver tabla 17*) e independientes (genéticas; *ver tabla 16*).

De este modo se trató de localizar aquellas características de los pacientes que por alguna razón pudieran estar relacionadas con las características genéticas, o que pudieran modificar la respuesta de los pacientes a clopidogrel.

VARIABLE	Total n=67 n (%)	CYP2C19 LOF n=18 n (%)	CYP2C19 No-LOF n=49 n (%)	p-valor
Diagnóstico (ICTUS)	53 (79.1)	13 (72.22)	40 (81.63)	0.401
Cirugía	8 (11.94)	1 (5.56)	7 (14.29)	0.433 *
Sexo (Mujeres)	24 (35.82)	5 (27.78)	19 (38.78)	0.405
Edad (Media±DS)	68.22 ± 9.83	66.78 ± 8.52	68.76 ± 10.30	0.432
FACTORES DE RIESGO				
EC previa	22 (32.84)	7 (38.89)	15 (30.61)	0.523
Hipercolesterolemia	48 (71.64)	16 (88.89)	32 (65.31)	0.057
HTA	53 (79.1)	15 (83.33)	38 (77.55)	0.606
Diabetes	28 (41.79)	7 (38.89)	21 (42.86)	0.770
Tabaquismo	11 (16.42)	5 (27.78)	6 (12.25)	0.128
AIT/ictus previo	28 (41.79)	8 (44.44)	20 (40.82)	0.790
Stent	9 (13.43)	4 (22.22)	5 (10.20)	0.236 *
TRATAMIENTO				
Antiagregante previo	48 (71.64)	14 (77.78)	34 (69.39)	0.559 *
AAS	20 (29.85)	4 (22.22)	16 (32.65)	0.408 *
B-bloq	16 (23.88)	5 (27.78)	11 (22.45)	0.650
Estatina	52 (77.61)	16 (88.89)	36 (73.47)	0.321 *
IECA	26 (38.81)	7 (38.89)	19 (38.78)	0.993
ARAI	20 (29.85)	5 (27.78)	15 (30.61)	0.822
Antagonistas Ca	15 (22.39)	1 (5.56)	14 (28.57)	0.053 *
IBP	30 (44.78)	10 (55.56)	20 (40.82)	0.282

DS: Desviación Estándar; HTA: Hipertensión arterial; EC previa: Antecedentes de enfermedad cardiológica. TRATAMIENTO: tratamiento prescrito al alta del ingreso por el que se recluta el paciente; AAS: Ácido Acetil Salicílico, B-bloq: B-bloqueantes; HBPM: Heparinas de bajo peso molecular; IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARAII: Antagonistas de los receptores de la angiotensina II; IBP: Inhibidores de la bomba de protones. *Test exacto de Fisher

Tabla 16: Características basales de la población (ictus/AIT) y su relación con los polimorfismos estudiados

Aquellas variables que en este análisis bivalente mostraron una asociación con el evento primario o las variables genéticas, con un valor de $p < 0.1$, se consideraron estadísticamente significativas para su inclusión en el

modelo final (multivariante). Así, al incluirlas en el modelo multivariante podríamos saber la influencia real de los polimorfismos estudiados sobre la respuesta a clopidogrel.

La presencia del *CYP2C19*2* mostró una asociación significativa ($p < 0.1$) con el hipercolesterolemia ($p = 0.058$) y con el tratamiento concomitante con antagonistas del Ca durante el tiempo de seguimiento ($p = 0.053$).

Al comparar la influencia de todas las covariables del estudio sobre el evento primario (eficacia o respuesta), los antecedentes de enfermedad cardiológica mostraron una asociación significativa con un valor de $p = 0.029$.

Al igual que en el estudio en pacientes con EAP, como ya hemos explicado, las asociaciones con las variantes genéticas estudiadas pueden deberse al azar, debido a la baja frecuencia de estas, la “n” del estudio, y el hecho de que no todos los pacientes presentan cada una de las variables.

Respecto las variables asociadas a la respuesta o evento primario, como acabamos de comentar, los antecedentes de enfermedad cardiológica se asocian con la respuesta con un valor de $p = 0.029$, esto es lógico si tenemos en cuenta que el evento primario es la combinada de muerte CV, ictus/AIT e IAM y que hasta el 40% de los ictus vienen precedidos de otro ictus o AIT durante la semana previa (35), además, entre los pacientes reclutados, 14 (20.9%) ya tomaban clopidogrel antes del diagnóstico por el que fueron reclutados.

Respecto a la asociación del resto de SNP con el resto de las variables estudiadas, ni *CYP2C19* GOF (portadores *CYP2C19*17*), ni *ABCB1* LOF (genotipo *ABCB1 TT*), ni LOF combinado (*ABCB1* LOF y/o *CYP2C19* LOF) mostraron una asociación con $p < 0.1$ con ninguna de las variables recogidas sobre los pacientes en estudio.

VARIABLE	Total n=67 n (%)	Evento SI n=14 n (%)	Evento NO n=52 n (%)	p-valor
Diagnóstico (ICTUS)	53 (79.1)	12 (85.71)	41 (78.85)	0.494
Cirugía	8 (11.94)	1 (7.14)	7 (13.46)	1 *
Sexo (Mujeres)	24 (35.82)	6 (42.86)	18 (34.62)	0.537
Edad (Media ± DS)	68.22 ± 9.83	67.79 ± 7.71	68.34 ± 10.37	0.853
FACTORES DE RIESGO				
EC previa	22 (32.84)	8 (57.14)	14 (26.92)	0.029
Hipercolesterolemia	48 (71.64)	11 (78.57)	37 (71.15)	0.741 *
HTA	53 (79.1)	12 (85.71)	41 (78.85)	0.717 *
Diabetes	28 (41.79)	7 (50)	21 (40.39)	0.484
Tabaquismo	11 (16.42)	3 (21.43)	8 (15.39)	0.686 *
AIT/ictus previo	28 (41.79)	12 (85.71)	41 (78.85)	0.717 *
Stent	9 (13.43)	2 (14.29)	7 (13.46)	1 *
TRATAMIENTO				
Antiagregante previo	48 (71.64)	12 (85.71)	36 (69.23)	0.318
AAS	20 (29.85)	2 (14.29)	18 (34.62)	0.200 *
B-bloq	16 (23.88)	4 (28.57)	12 (23.08)	0.728 *
Estatina	52 (77.61)	11 (78.57)	41 (78.85)	1 *
IECA	26 (38.81)	7 (50)	19 (36.54)	0.334
ARAI	20 (29.85)	2 (14.29)	18 (34.62)	0.200 *
Antagonistas Ca	15 (22.39)	1 (7.14)	14 (26.92)	0.164 *
IBP	30 (44.78)	7 (50)	23 (44.23)	0.659

DS: Desviación Estándar; HTA: Hipertensión arterial; EC previa: Antecedentes de enfermedad cardiológica.

TRATAMIENTO: tratamiento prescrito al alta del ingreso por el que se recluta el paciente; AAS: Ácido Acetil Salicílico, B-bloq: B-bloqueantes; HBPM: Heparinas de bajo peso molecular; IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARAII: Antagonistas de los receptores de la angiotensina II; IBP: Inhibidores de la bomba de protones.

*Test exacto de Fisher

Tabla 17: Características basales de la población (ictus/AIT) y su relación con el evento primario

2.4 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EVENTO PRIMARIO Y POLIMORFISMOS (OBJETIVO PRIMARIO)

La eficacia del clopidogrel en función de la presencia de los polimorfismos se comparó midiendo la aparición del evento primario, entendiendo como tal, la combinada de muerte CV, ictus o AIT e IAM.

Se estudió la influencia sobre la eficacia, en función de la presencia, independiente o combinada, de los SNP *CYP2C19*2*, **17* y *ABCB1 C3435T*. Además, los resultados se ajustaron en un modelo multivariante (*Ver tabla 18*), que incluyó las variables que en el análisis bivariante mostraron una asociación con la respuesta y/o los polimorfismos, con $p < 0.1$.

De acuerdo con el genotipo *CYP2C19*2*, los pacientes portadores de este SNP (*CYP2C19*1/*2* o **2/*2*) mostraron un mayor riesgo de sufrir el evento primario (OR= 3.82; IC 95%= 1.1 - 13.2; $p = 0.028$) que los no portadores (*CYP2C19*1/*1* o no LOF) durante el tratamiento con clopidogrel.

Al repetir el análisis teniendo en cuenta el momento de la aparición del evento, analizando los datos mediante una regresión de *cox*, la significación estadística se mantuvo (HR=3.01; IC 95%=1.01-9.00; $p = 0.048$) confirmando los resultados previos.

El *ABCB1 C3435T*, de manera independiente, no mostró una asociación estadísticamente significativa ni con la respuesta ni con ninguna de las variables incluidas en el estudio en ninguno de los análisis realizados en pacientes con ictus o AIT.

La presencia del *CYP2C19*17* (*CYP2C19 GOF*), por su parte, no se asoció con ninguna de las covariables estudiadas, y, aunque al evaluar su influencia sobre la aparición del evento primario esta asociación tampoco alcanzó la significación estadística, si se encontró una tendencia en su asociación con la aparición del evento primario, contradiciendo los resultados en pacientes con EAP. Así, en pacientes con ictus o AIT, la presencia del *CYP2C19*17* (*CYP2C19*

GOF), muestra una tendencia hacia la protección frente la aparición del evento primario (OR=0.23; IC 95%=0.02-1.24; p=0.059).

Por otro lado, en el análisis multivariante, observamos que, al estudiar la asociación entre el evento primario y los 3 polimorfismos, CYP2C19 LOF mantiene la significación estadística obtenida en el análisis bivariante (OR=5.07; IC 95%=1.2-21.45; p=0.023) y CYP2C19 GOF alcanza esta significación (OR=0.19; IC 95%=0.03-1.09; p=0.037). En este análisis, respecto a la condición ABCB1 LOF observamos que, ésta casi se asocia de manera significativa con la respuesta (p=0.075). Aunque, basándonos en estos resultados no podemos confirmar su influencia sobre la respuesta a clopidogrel en pacientes con ictus o AIT.

	Evento primario SI n=14	Evento primario NO n=53	OR (IC 95%)	p-valor	HR (IC 95%)	p-valor
CYP2C19 LOF n=18	7 (38.89%)	11 (61.11%)	3.82 (1.1 - 13.2)	0.028	3.01 (1.01 - 9.00)	0.048
CYP2C19 No LOF n=49	7 (14.29%)	42 (85.71%)				
CYP2C19 GOF n=24	2 (8.33%)	22 (91.67%)	0.23 (0.02 - 1.24)	0.059	0.29 (0.06 - 1.34)	0.093
CYP2C19 No GOF n=43	12 (27.91%)	31 (72.09%)				
ABCB1 LOF n=11	3 (27.27%)	8 (72.72%)	1.53 (0.35 - 6.75)	0.569	1.25 (0.27-5.72)	0.774
ABCB1 No LOF n=56	11 (19.64%)	45 (80.36%)				

Tabla 18: Asociación entre polimorfismos y el evento primario en pacientes con ictus.

	OR (IC 95%) *	p-valor
CYP2C19 LOF	5.07 (1.2-21.45)	0.023
ABCB1 LOF	5.63 (0.86-36.99)	0.075
CYP2C19 GOF	0.19 (0.03-1.09)	0.037

* Datos ajustados por: “antecedentes de enfermedad cardíológica”, hipercolesterolemia, tratamiento concomitante con antagonistas del Ca y polimorfismos

Tabla 19: Asociación entre polimorfismos y el evento primario en pacientes con ictus/AIT (Multivariante).

Si evaluamos el efecto combinado que los polimorfismos LOF (*CYP2C19* y *ABCB1*) tienen sobre el evento primario, observamos que los pacientes portadores de *CYP2C19**2 o con un genotipo *ABCB1* 3435TT alcanzan tasas más altas de eventos cardiovasculares mayores (evento primario) (OR=4.47; IC 95%=1.23 - 16.22; p=0.017), incluso cuando ajustamos los resultados dependiendo de la presencia del *CYP2C19**17 (OR=5.22; IC 95%=1.36 - 20.01; p=0.011). Por último, entre los pacientes reclutados, solo 4 (5.97%) eran portadores de *CYP2C19**2 y *17, es decir, eran portadores de un alelo GOF y LOF al mismo tiempo, ninguno de ellos experimentó un evento primario durante el tiempo de seguimiento.

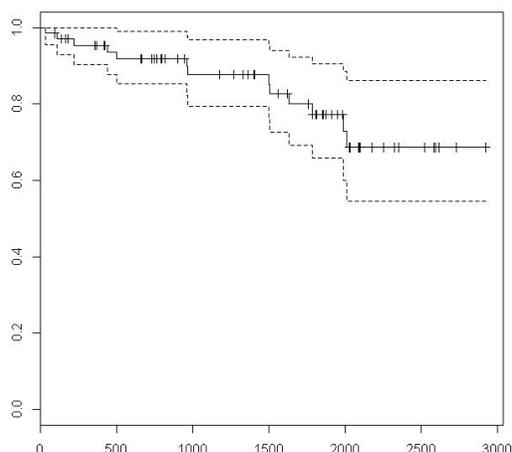


Figura 11: Curva de supervivencia (censura: IAM, ictus/AIT, muerte CV) en ictus/AIT

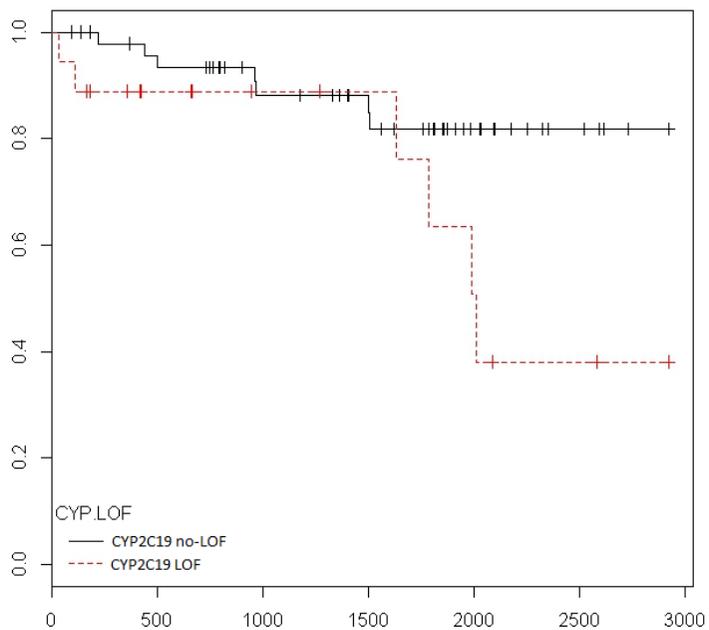


Figura 12: Curva de supervivencia en función de CYP2C19 LOF en ictus/AIT

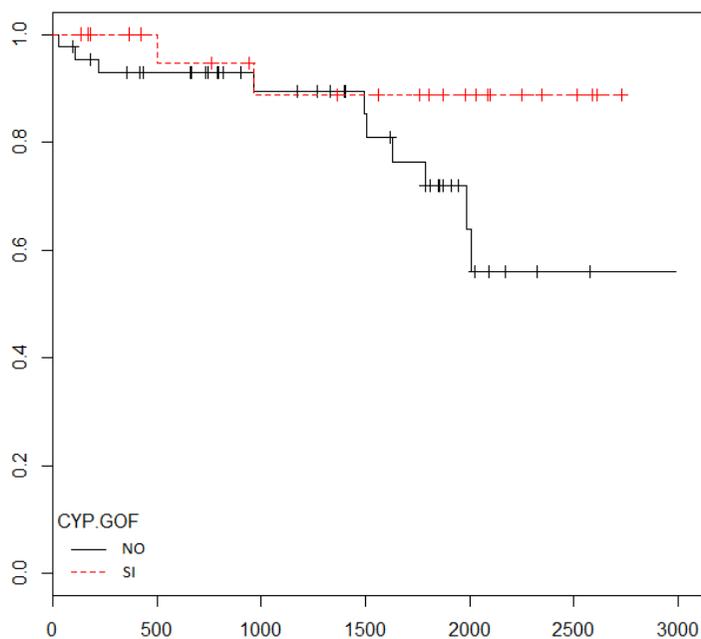


Figura 13: Curva de supervivencia en función de CYP2C19 GOF en ictus/AIT

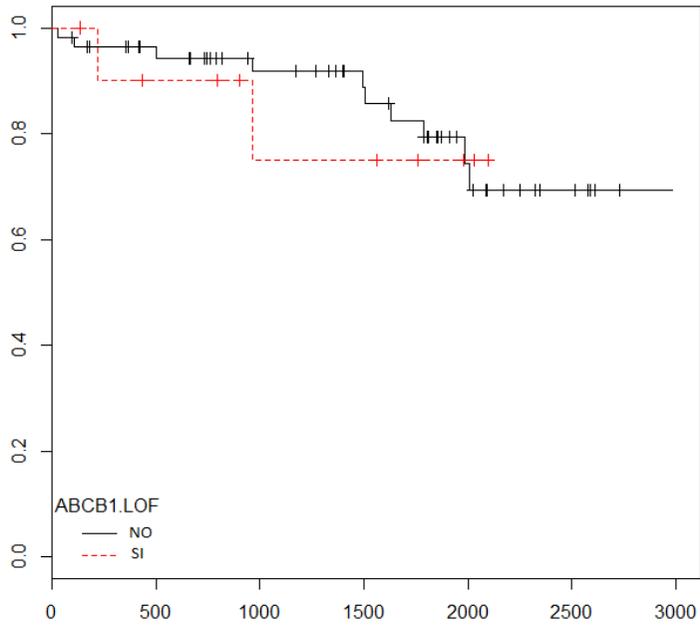


Figura 14: Curva de supervivencia en función de ABCB1 LOF en ictus/AIT

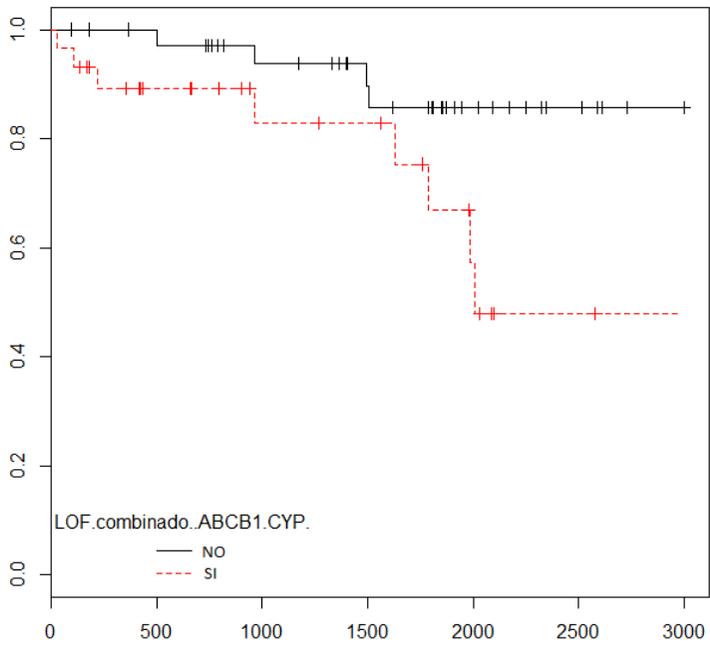


Figura 15: Curva de supervivencia en función de LOF (CYP2C19 y ABCB1 combinados) en ictus/AIT



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. ASPECTOS RELEVANTES Y NOVEDADES QUE APORTA ESTE TRABAJO

Hasta la realización de este trabajo, habían valorado la influencia de diferentes variantes genéticas en la clínica de pacientes diagnosticadas de SCA y tratados con clopidogrel en multitud de ocasiones (136, 137, 139-141, 146).

Sin embargo, en pacientes con EAP de miembros inferiores sometidos a una ATP, no existía evidencia de la influencia de polimorfismos genéticos que afectaran a la respuesta antiagregante de los pacientes al clopidogrel. Por este motivo, decidimos estudiar la asociación de las variantes genéticas en los genes *ABCB1* y *CYP2C19* con la respuesta a clopidogrel en una cohorte de pacientes españoles con EAP y sometidos a ATP, y, además, realizar un metaanálisis combinando los resultados obtenidos en nuestros pacientes con los obtenidos en pacientes asiáticos.

En pacientes con ECV, se había estudiado la influencia del *CYP2C19**2 sobre la respuesta a clopidogrel (*Ver tabla 6*), aunque, dependiendo del tiempo de seguimiento, diagnóstico del paciente (ictus o AIT) y variable respuesta estudiada, se mostraron resultados contradictorios (147-150, 152). Nuestro estudio valora por primera vez esta influencia en pacientes con ictus o AIT en tratamientos con clopidogrel de larga duración, y es el segundo estudio que lo hace en pacientes europeos, aunque el anteriormente publicado, el sub estudio genético de CHANCE (156) lo hace en solo 3 meses de seguimiento. Además, es la primera vez que se estudia la influencia del *ABCB1 3435C>T* sobre la eficacia del clopidogrel en estos pacientes, de manera independiente, y combinado con la presencia de polimorfismos en el gen *CYP2C19*.

Por otro lado, es la primera vez que se valora la influencia del *SNP*

*CYP2C19*17* en la respuesta a clopidogrel en pacientes con EAP o ECV (ictus o AIT).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran también por primera vez que, en pacientes con EAP sometidos a ATP, la presencia independiente o combinada del SNP *CYP2C19*2* (Genotipos *CYP2C19*1/*2* ó *CYP2C19*2/*2*) y/o un genotipo *ABCB1 3435TT* influyen en la eficacia clínica del clopidogrel.

Los individuos portadores del alelo *CYP2C19*2* tienen un mayor riesgo de eventos isquémicos que los pacientes no portadores de este alelo tratados con clopidogrel en 12 meses de tratamiento (OR=4.89; IC95%=1.32-12.83; p=0.018). De manera similar, esta asociación fue estadísticamente significativa para el análisis combinado de la presencia del *CYP2C19*2* y el genotipo *ABCB1 TT* (OR=4.66; IC95%=1.37-15.84; p=0.014).

Por su parte, el estudio de asociación entre el *ABCB1 3435C>T* y la respuesta en pacientes con EAP dio lugar a resultados contradictorios. El genotipo *ABCB1 3435 TT*, de manera independiente, no se consiguió relacionar significativamente con la aparición del evento primario en el análisis crudo (p=0.187) ni en el multivariante (p=0.120); en cambio, al incluir al resto de los polimorfismos en el análisis, a fin de valorar el peso de cada uno sobre la respuesta (aparición del evento primario), los individuos con un genotipo homocigoto recesivo (*ABCB1 3435 TT*) mostraron un riesgo significativamente superior de sufrir el evento primario que los individuos *wildtype* o heterocigotos (OR=3.82; IC95%=1.04-14.06; p=0.043). Esto puede deberse a la presencia del *CYP2C19*17*, que, en teoría, tendría un efecto contrario sobre la eficacia del clopidogrel que los SNP *CYP2C19*2* y *ABCB1 3435C>T*. Así, su presencia combinada en pacientes *ABCB1 TT* podría estar enmascarando la aparición del evento primario.

Además, en esta cohorte de pacientes (EAP sometidos a ATP), por

primera vez estos polimorfismos se asociaron de manera independiente con la mala evolución de los pacientes (objetivo secundario) en función del grado de Fontaine/Rutherford (CYP2C19LOF: OR=8.31; IC95%=2.36-29.16; p=0.001) (ABCB1 LOF: OR=4.75; IC95%=1.32-17.07; p=0.017) y, de manera combinada demostraron, además de esta asociación (LOF combinado vs evolución de Fontaine: OR=13.96; IC95%=4.44-43.80; p=<0.001), estar relacionados con la mala evolución de las ondas pletismográficas (LOF combinado: OR=4.35; IC95%=1.14-16.49; p=0.031) y de la distancia de claudicación (LOF combinado: OR=6.28; IC95%=1.60-24.56; p=0.008); aunque, la mala evolución del ITB no se asoció de manera estadísticamente significativa con ninguno de los SNP estudiados (p=>0.05).

En este sentido, parece que la presencia del CYP2C19*2 es el factor determinante en la asociación entre polimorfismos y las covariables del estudio, ya que, su presencia independiente se asoció significativamente con la mala evolución de la distancia de claudicación de los pacientes durante 12 meses (OR=6.22; IC95%=1.31-29.44; p=0.021), mientras que el genotipo ABCB1 3435 TT, si no se incluye combinado con la presencia del CYP2C19*2 en el análisis, no muestra una asociación estadísticamente significativa.

En la cohorte de pacientes con ECV, respecto a la relación entre la presencia del CYP2C19*2 y la aparición del evento primario, nuestros resultados confirmaron los obtenidos en EAP y los mostrados por la bibliografía disponible (*ver tabla 6*) antes de la realización del estudio. Así, los pacientes con genotipos CYP2C19*1/*2 y CYP2C19*2/*2 (CYP2C19 LOF) se relacionaron significativamente con un aumento del riesgo de padecer la combinada de ictus/AIT, IAM o muerte CV (evento primario), tanto en el análisis crudo (OR=3.01; IC95%=1.01-9.00; p=0.048), como en el multivariante (OR=5.07; IC95%=1.20-21.45; p=0.023). En cambio, el SNP ABCB1 C3435T, no consiguió asociarse significativamente con la respuesta en

el análisis crudo ($p=0.774$), aunque, en el análisis multivariante, al igual que en la cohorte de pacientes con EAP, al incluirse el resto de los polimorfismos, el genotipo *ABCB1 3435TT* baja significativamente el p -valor, mostrando una tendencia a su asociación con un aumento del riesgo de padecer el evento primario (OR=5.63; IC95%=0.86-36.99; $p=0.075$). Pero como podemos observar, este p -valor no llega a mostrarse estadísticamente significativo ($p<0.05$).

Respecto a la influencia del SNP *CYP2C19*17* sobre la aparición del evento primario en ambas cohortes (EAP o ECV), como venimos comentando, debemos destacar que este polimorfismo está asociado con un aumento de la expresión de la región del ADN que codifica la enzima CYP2C19, así, su presencia, en teoría, aumentaría la conversión de clopidogrel en su metabolito activo y por tanto aumentaría el efecto antiagregante de éste, lo que provocaría en nuestros pacientes, una disminución en la incidencia del evento primario. Como se preveía, la presencia del *CYP2C19*17* en pacientes con ECV en tratamiento con clopidogrel de larga duración se asoció significativamente con la disminución del riesgo de aparición del evento primario (combinada de ictus/AIT, IAM, muerte CV) (OR=0.19; IC95%=0.03-1.09; $p=0.037$). En cambio, en pacientes con EAP, tratados durante solo 12 meses, donde el calibre de los vasos es significativamente menor y los procesos isquémicos se manifiestan de manera mucho más aguda, esta asociación no mostró valores estadísticamente significativos ($p=0.868$).

2. COMPARACIÓN CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN SCA

Los resultados obtenidos en pacientes con EAP sometidos a ATP o ECV confirman los que previamente se habían publicado en pacientes con SCA. En éstos, se había demostrado que, en individuos diagnosticados con SCA de alto riesgo isquémico tratados con clopidogrel, los alelos *CYP2C19 LOF* son un factor determinante en la ocurrencia de eventos cardiovasculares mayores (136, 137, 139, 142, 146, 148, 186), y particularmente, de la trombosis del *stent* implantado durante la ICP (137, 146, 186-189). En cambio, en pacientes con SCA de bajo riesgo isquémico, esta asociación es menos evidente (190, 191).

Del mismo modo en nuestros pacientes, en la cohorte compuesta por pacientes con EAP y sometidos a ATP, o de alto riesgo isquémico, la presencia de alelos involucrados en la pérdida de función de la isoenzima *CYP2C19* es un factor determinante en la aparición de eventos isquémicos en los territorios vasculares intervenidos quirúrgicamente. Y, en la cohorte compuesta por pacientes con ictus o AIT, o de menor riesgo isquémico, la influencia de la presencia de alelos *CYP2C19 LOF* sobre la respuesta de los pacientes al clopidogrel, aunque existe, es menos evidente.

Respecto al papel que juegan los SNP *ABCB1* sobre la aparición de eventos cardiovasculares isquémicos, nuestros resultados confirman la controversia mostrada previamente en pacientes con SCA (136, 146, 147, 192). Así, en los análisis en crudo y multivariante, valorando la influencia del genotipo homocigoto recesivo (*ABCB1 3435 TT*) sobre la respuesta, no se encontró una relación significativa. Pero, al incluir la presencia del *CYP2C19*17* en el análisis, en pacientes con EAP, esta asociación alcanza la significación estadística. Y, en pacientes con ECV, la presencia de este polimorfismo provoca un descenso del orden de magnitud en el p-valor (de 0.774 a 0.075), a pesar de que en estos pacientes se manifiesta un número de

eventos mucho menor.

Es importante destacar que en los estudios que valoran la influencia del *ABCB1 C3435T* sobre la respuesta a clopidogrel y que concluyeron que no existe relación entre el polimorfismo y la aparición del evento primario, no se tuvo en cuenta la presencia del *CYP2C19*17*, que al estar relacionado con un aumento de la función (GOF) de la *CYP2C19*, podría estar enmascarando la aparición del evento primario y, por tanto, distorsionando la influencia real que el *ABCB1 C3435T* tiene sobre la respuesta.

En los pacientes con EAP y ATP, los valores de los riesgos obtenidos al valorar la influencia del *CYP2C19*2* sobre la respuesta son significativamente altos si los comparamos con los resultados obtenidos en pacientes con SCA sometidos a ICP, aunque, similares a los obtenidos en el estudio realizado en pacientes asiáticos. Esto puede deberse a que en pacientes con SCA que son sometidos a una ICP, el tratamiento antiagregante al alta de la intervención consiste en una doble terapia antiagregante con AAS durante al menos un mes, pero, entre nuestros pacientes únicamente el 44.4% de los pacientes recibieron doble terapia antiagregante al alta de la cirugía, aunque no pudimos confirmar esta teoría entre nuestros pacientes debido al tamaño muestral del estudio que realizamos entre pacientes con EAP.

3. COMPARACIÓN DE DISEÑO Y RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS (EAP/ECV)

Como venimos comentando, para este trabajo, se decidió realizar 2 estudios diferenciados, valorando independientemente la influencia que los SNP *CYP2C19* y *ABCB1* tienen sobre la eficacia del clopidogrel en pacientes con ECV, por un lado, y con EAP sometidos a ATP por otro. Esto fue así porque, a pesar de que el clopidogrel tiene indicado su uso tanto en pacientes con EAP como con ECV, estos presentan una serie de diferencias fundamentales a la hora de diseñar un estudio para cumplir los objetivos que nos propusimos, estas son:

1. Riesgo isquémico mayor en EAP: La EAP fundamenta su etiología en la evolución a lo largo de la vida, así, se considera un éxito la no evolución de la enfermedad. Entre los pacientes con EAP reclutados para el estudio, todos han sido sometidos a una ATP, esto significa que antes de la cirugía ya habían presentado al menos la sintomatología característica de un grado IIb de Fontaine. Si tenemos en cuenta las altas tasas de re-estenosis y reintervenciones que presentan estos pacientes, podíamos prever una tasa alta del evento primario del estudio. En cambio, en pacientes con ECV, la tasa de eventos isquémicos es altamente variable dependiendo del tipo de paciente, es decir, del diagnóstico (ictus o AIT), edad, estado basal, antecedentes de enfermedad cardiovascular etc.

2. Estado basal de los pacientes: Como acabamos de comentar, el estado basal (t=0 de seguimiento) es fundamental a la hora de prever la aparición del evento primario, y por tanto del cálculo muestral en concreto y diseño del estudio en general. Este aspecto es fácilmente demostrable si observamos las características basales de los pacientes de ambos estudios (*Ver tablas 10,11,16,17*). De hecho,

todos los pacientes con EAP han sido sometidos a una ATP, en cambio, para alcanzar el número de pacientes mínimo para la realización del estudio en individuos con ictus intervenidos quirúrgicamente hubiera sido necesario un reclutamiento durante más de 5 años, tiempo en el cual, la evolución en el manejo clínico de estos pacientes hubiera hecho imposible evaluar los objetivos de este estudio.

3. Tiempo de tratamiento: En EAP, el clopidogrel se utiliza habitualmente en doble terapia antiagregante con AAS durante el primer año después de una intervención quirúrgica, manteniendo el AAS en monoterapia tras estos 12 primeros meses de tratamiento. Por su lado, en ECV, no está indicando el uso de la doble terapia antiagregante, así, el clopidogrel suele utilizarse indefinidamente y en monoterapia desde el diagnóstico; aunque, basándose en los resultados obtenidos en SCA o en pacientes con diagnóstico de enfermedad coronaria, algunos médicos se decantan por prescribir la doble terapia antiagregante de AAS y clopidogrel durante un mes.

4. Tiempo de seguimiento: La alta tasa de eventos isquémicos que manifiestan habitualmente los pacientes con EAP intervenidos quirúrgicamente permitió un seguimiento de 12 meses. Además, hay que tener en cuenta que, como acabamos de comentar, el clopidogrel se utiliza habitualmente en doble terapia antiagregante con AAS durante el primer año después de una intervención quirúrgica, manteniendo el AAS en monoterapia tras estos 12 primeros meses de tratamiento. Mientras, en ECV es más habitual encontrar pacientes tratados con clopidogrel en monoterapia indefinida después de haber sufrido un ictus o AIT.

5. Calibre de los vasos: El mayor calibre de las arterias que

irrigan el cerebro en comparación con el calibre variable de los vasos encargados de la distribución distal de la sangre en el organismo provoca que la posible aparición de eventos isquémicos derivados de una deficiente eficacia antiagregante del clopidogrel sea mucho más previsible en EAP que en ECV.

Si tenemos en cuenta estas diferencias, hemos visto que es lógico pensar que para este estudio se debían haber seleccionado pacientes con ECV intervenidos quirúrgicamente, y así poder valorar el mismo tipo de evento en el mismo tiempo de seguimiento y valorar la influencia del resto de las variables diferenciadoras entre ambas cohortes en un análisis multivariante. Esto no fue así porque el número de intervenciones quirúrgicas en pacientes con ictus o AIT es sensiblemente menor que en EAP, además, la técnica utilizada suele consistir en una tromboendarterectomía en vez de una angioplastia y el tratamiento y prevención posterior son fundamentalmente diferentes. De hecho, entre el total de pacientes reclutados con ECV tratados con clopidogrel solo 9 habían sido intervenidos quirúrgicamente y a todos se les había implantado al menos un *stent*.

Si observamos detenidamente los resultados obtenidos en ambos estudios, destacan las siguientes diferencias:

1. La presencia del SNP *CYP2C19*2* se asoció significativamente con una peor respuesta antiagregante en pacientes con EAP y ECV, aunque, los valores de OR, HR, IC95% y p-valor obtenidos en ambos estudios son particularmente diferentes (*Ver tablas 12, 13, 18, 19*) y muestran una asociación mucho más evidente (OR y HR mayores y p-valor menor) en los resultados obtenidos en pacientes con EAP.

En pacientes con EAP, el evento estudiado (variable respuesta) es la re-estenosis del territorio vascular intervenido durante la cirugía. Así, tras ésta, suponemos que el vaso/s intervenido se encuentra en

buen estado funcional, y, en caso de volver a estenosarse en un periodo relativamente corto (12 meses), es probable que se deba a una mala función de los fármacos antiagregantes utilizados, y que han demostrado, sin tener en cuenta la influencia de los polimorfismos genéticos sobre la respuesta, disminuir de manera evidente la aparición de eventos isquémicos. En cambio, el evento primario medido en pacientes con ictus/AIT fue la combinada de ictus o AIT, IAM y muerte CV, cuya etiología es mucho más variable (estrés, comorbilidades etc.). Así, es lógico que, debido al tipo de evento medido, la influencia de polimorfismos que afecten a la respuesta del clopidogrel sea más evidente en pacientes con EAP.

2. El genotipo *ABCB1 3435 TT* se relacionó significativamente con la respuesta en pacientes con EAP cuando se valora su influencia sobre la respuesta teniendo en cuenta la presencia del resto de polimorfismos genéticos. En cambio, en pacientes con ECV, aunque con un p-valor cercano a esta significación ($p=0.075$), no podemos afirmar que la presencia de este genotipo afecte a la respuesta.

Como en el punto anterior, la variable respuesta considerada en cada estudio para ser la causa de esta diferencia. Si nos fijamos en la frecuencia observada de los eventos primarios de cada estudio observamos que, en pacientes con EAP es sensiblemente superior que en ECV (34.72% eventos primarios en EAP, 21.00% en ECV).

3. Curiosamente, la presencia del *CYP2C19*17* en pacientes con EAP no se relacionó significativamente con la respuesta. Pero, en pacientes con ECV, la presencia de este polimorfismo se asoció con una disminución del riesgo de sufrir el evento primario al ser tratados con clopidogrel.

En pacientes con ECV, el desarrollo de complicaciones derivadas

de una ineficiente terapia antiagregante, y por tanto del evento primario, se manifiesta a largo plazo por diferentes razones que ya hemos aclarado (calibre del vaso, estado basal de los pacientes, etiología de la enfermedad etc.). La manera en la que la presencia de alelos *CYP2C19 LOF* y *GOF* influyen en la eficacia del clopidogrel es fundamentalmente diferente. Mientras que el *CYP2C19*17* provoca a un aumento de la expresión de la enzima y así un aumento del efecto antiagregante, el *CYP2C19*2* da lugar a un *splicing* aberrante que se traduce en una enzima afuncional. De alguna manera, todo esto genera diferencias fundamentales en la influencia del *CYP2C19*17* sobre la variable respuesta.

4. Características basales de los pacientes: Si observamos las frecuencias recogidas en BL respecto a factores de riesgo, tratamiento concomitante y variables clínicas, también observamos diferencias fundamentales. Entre los pacientes con ECV sólo el 16.42% eran fumadores y entre los individuos con EAP lo eran el 66.7%; esto se debe a que en pacientes con EAP, en la historia clínica digital del paciente se refleja si estos fueron fumadores en algún momento desde el diagnóstico, que pudo haber sido, incluso años antes de ser intervenidos quirúrgicamente y tratados con clopidogrel; y, por tanto, candidatos a ser reclutados. En pacientes con ECV, la historia clínica refleja si los pacientes eran fumadores en el momento de padecer el ictus por el que se reclutan para el estudio. Además, la proporción de pacientes diabéticos o con hipercolesterolemia en BL también mostraron valores variables; 68.1% de pacientes diabéticos con EAP frente un 41.79% con ECV; y un 51.4% con hipercolesterolemia con EAP frente un 71.64% entre aquellos con ECV

4. RELEVANCIA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Debido a los resultados obtenidos en SCA, tanto el *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) como la *Royal Dutch Pharmacogenomics Working Group* (DPWG) publicaron guías de dosificación basadas en información farmacogenética que recomiendan el cambio de tratamiento antiagregante en pacientes tratados con clopidogrel y portadores de polimorfismos LOF en el gen *CYP2C19* (SNP *CYP2C19*2-*8*) (169, 170). Aunque, esta recomendación, basándose en la evidencia actual, solo afecta a pacientes que hayan sufrido un SCA y hayan sido sometidos a una ICP.

En pacientes con EAP, el clopidogrel demostró una mayor eficacia que el AAS. Por otro lado, la doble y triple terapia antiagregante no han demostrado tan buenos resultados como en el tratamiento del SCA, y, por tanto, la estrategia antiagregante suele consistir en el uso en monoterapia de clopidogrel. De este modo, la presencia de variantes genéticas asociadas a una respuesta variable del clopidogrel en pacientes tratados con este fármaco para esta indicación, pueden suponer un condicionante importante en la eficacia del tratamiento y así, en la evolución clínica del paciente.

La influencia de la presencia de estos polimorfismos en la respuesta a clopidogrel en apacientes con EAP se supone más determinante que en pacientes con SCA, si tenemos en cuenta que el uso del clopidogrel se realiza en monoterapia para esta indicación de uso.

A pesar de esto, ninguna de las guías de dosificación basadas en farmacogenética disponibles hace recomendaciones terapéuticas respecto al tratamiento con clopidogrel en pacientes con EAP portadores del *CYP2C19*2*.

De forma similar al tratamiento antiagregante con clopidogrel en EAP, en pacientes con ECV, aunque su eficacia demostró ser menor que en el resto de las indicaciones, mostró resultados similares. Y al igual que en pacientes con EAP, el uso de doble terapia antiagregante demostró aumentar el riesgo de

hemorragias en pacientes con ECV.

Así con todo, al igual que en pacientes con EAP, la presencia de polimorfismos genéticos asociados a una disminución de la eficacia del clopidogrel, en pacientes con ECV tratados con este fármaco, puede suponer un factor preventivo de la eficacia del tratamiento y así, de la evolución de los pacientes.

Teniendo en cuenta todo esto, y basándonos en nuestros resultados, que indican que los portadores de alelos *CYP2C19 LOF* tienen una peor respuesta a clopidogrel que los no portadores en el tratamiento antiagregante de la EAP o ECV, al igual que en SCA se recomienda el cambio de tratamiento antiagregante en esos pacientes, podemos proponer 2 recomendaciones terapéuticas alternativas para pacientes *CYP2C19 LOF* con EAP tratados con clopidogrel:

1. Cambio de tratamiento: Ya que los resultados muestran que los polimorfismos *LOF* tienen una mayor influencia en la respuesta a clopidogrel en pacientes con EAP que en el tratamiento del SCA, es lógico pensar que el cambio de tratamiento antiagregante, que ha demostrado ser una alternativa eficaz en SCA, puede obtener resultados similares en el tratamiento de la EAP.

2. Aumento de dosis: La presencia de alelos *LOF* demostró una disminución de la eficacia del clopidogrel en pacientes con SCA, EAP o ECV. En SCA, el cambio de tratamiento demostró ser una alternativa eficaz a esta disminución del efecto antiagregante del clopidogrel. En cambio, en el tratamiento antiagregante de la EAP las alternativas terapéuticas son más limitadas ya que los “nuevos” fármacos antiagregantes, Prasugrel y Ticagrelor, no demostraron mejorar la eficacia de AAS y clopidogrel y, en cambio, si aumentaron el riesgo de sangrado. De este modo, proponer un aumento de dosis

del clopidogrel como alternativa terapéutica en pacientes LOF tratados con este fármaco, podría ser una alternativa eficaz.

De cualquier modo, es necesario realizar un ensayo clínico valorando la eficacia de orientar el tratamiento antiagregante con clopidogrel en pacientes con EAP o ECV, en el que se consideren estas diferentes alternativas terapéuticas utilizadas para compensar la disminución de la eficacia a causa de la presencia de los SNP *CYP2C19 LOF*.

Por otro lado, en pacientes con ECV, la presencia del *CYP2C19*17* se asoció significativamente con una disminución del riesgo de padecer el evento primario (combinada de ictus, IAM y/o muerte CV), por lo que su presencia en estos pacientes, al igual que la del *CYP2C19*2*, debería determinarse previa al inicio del tratamiento con clopidogrel.

5. LIMITACIONES

1. Este trabajo evalúa los objetivos planteados en una población local, aunque es de utilidad para valorar las posibles implicaciones de los resultados en la práctica clínica real entre nuestros pacientes, si quisiéramos inferir los resultados en la población en general o al menos europea, sería necesario reproducir el estudio. Debido al perfil de los pacientes que se valoraron para ser incluidos en el estudio, sobre todo en el estudio con pacientes con EAP, parecía más apropiado reclutar pacientes de un único hospital, por la práctica clínica similar a la que se son sometidos. Hay que tener en cuenta que la tasa de eventos isquémicos entre estos pacientes depende en gran medida del éxito de la cirugía y el estado basal de los pacientes tras ésta, lo cual depende en parte de la habilidad misma del cirujano. Por tanto, al plantear un estudio unicéntrico, se procuró reducir al máximo la influencia de variables confundentes dependientes de la práctica clínica de cada hospital sobre la respuesta en los dos estudios realizados.

2. Se realizó un estudio retrospectivo, porque a diferencia de en SCA, en EAP y ECV no existe la suficiente evidencia como para orientar el tratamiento antiagregante en función del genotipo *CYP2C19* y *ABCB1*; por tanto, no habría sido ético. Además, al intervenir sobre el tratamiento, implicaría la realización de un ensayo clínico en vez de un estudio observacional, lo cual supone una serie de exigencias metodológicas y de financiación. Observado los resultados obtenidos, es necesaria la realización de un ensayo clínico valorando la posible reducción de eventos isquémicos al orientar el tratamiento antiagregante en función de la presencia de polimorfismos genéticos que hayan demostrado influir en la respuesta del fármaco. Además, para la implementación de un genotipado preventivo previo al inicio de un

tratamiento, cual sea, una vez valorados todos estos aspectos, también es necesaria la realización de un estudio económico que valore el beneficio económico de esta implementación, diferenciando entre las diferentes alternativas propuestas para sustituir la práctica clínica en la actualidad.

3. En el estudio en pacientes con EAP se encontró que 14 pacientes ya habían fallecido antes del reclutamiento. En el estudio en pacientes con ictus o AIT fueron 5 los *exitus* antes del reclutamiento. Este hecho podría suponer una subestimación de los eventos primarios contabilizados en ambos estudios, y, por tanto, de la influencia de los polimorfismos LOF sobre la respuesta, ya que quizás, entre los pacientes fallecidos la frecuencia de los alelos LOF asociados a una menor respuesta antiagregante podría ser significativamente mayor que en el resto de la población.

4. No se pudo obtener información o no era suficientemente fiable respecto a algunas variables previamente asociadas con la respuesta antiagregante de los pacientes tratados con clopidogrel: longitud y tipo de stents, *run-off* y pérdida de tejido, reactividad plaquetaria (estudios de agregación) y riesgo de sangrado.

5. Nuestra población no se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg para *ABCB1 3435C>T* comparado con la población incluida en el EUR1000 Genomes. Aunque, la población del EUR1000 tampoco cumple este equilibrio al compararla con una población control de Granada ni con la población incluida en el IBS1000 Genomes Project, de hecho, en la población europea, que también incluye a individuos de la península ibérica, el alelo G es el alelo menor, mientras que, en el IBS1000, con individuos exclusivamente de la península ibérica, los controles de Granada y la cohorte de nuestro estudio, el alelo T es el

alelo menor. Por esto, parece que existe algún factor ambiental que hace que la herencia de este polimorfismo sea diferente entre la península ibérica y el resto de Europa.

6. En este estudio se consideraron con una ganancia de función del CYP2C19 (CYP2C19 GOF) aquellos pacientes portadores del *CYP2C19*17* (Genotipos *CYP2C19*1/*17* y **17/*17*), es decir, se consideró que, la presencia de un único alelo “mutado” era suficiente como para alterar la función de la enzima de manera suficiente como para modificar la respuesta de los pacientes a clopidogrel. En este sentido, las principales guías de dosificación basadas en información farmacogenética (DPWG y CPIC) clasifican a los individuos en GOF o no-GOF siguiendo principios diferentes. Así, las guías CPIC consideran CYP2C19 GOF a los individuos portadores de un alelo *CYP2C19*17* (Genotipo *CYP2C19*1/*17* o *CYP2C19*17/*17*) (169), mientras, las guías DPWG únicamente consideran CYP2C19 GOF a los individuos con un genotipo *CYP2C19*17/*17* (Homocigotos recesivos) (170).

Si tenemos en cuenta la alta evidencia encontrada en el SCA, y observamos nuestros resultados, podemos predecir que a pesar de estas limitaciones los resultados obtenidos se mantendrán en la misma dirección.

6. IMPLICACIONES EN OTRAS ÁREAS DE CONOCIMIENTO

1. Si tenemos en cuenta las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos, en concreto las diferencias que hemos comentado respecto la frecuencia del *ABCB1C3435T* entre la población de la península y Granada respecto la población europea en general, se refuerza la teoría de la necesidad de estudiar paneles de genes locales al implementar las pruebas genéticas del tipo que sean en la práctica clínica.

La tendencia actual consiste en el desarrollo de paneles de variantes genéticas del genoma importantes en la práctica clínica, sin diferenciar en que población se van a analizar, y los laboratorios y casas comerciales orientan sus esfuerzos en este sentido. En cambio, en el área de la farmacogenética, observamos cómo los polimorfismos que afectan a la respuesta de los medicamentos se presentan con frecuencias diferentes entre las poblaciones y por tanto muestran resultados contradictorios en su asociación a la respuesta de los fármacos, a igualdad de número de pacientes, dependiendo de la población. Además, teniendo en cuenta esto, si valoráramos el impacto económico y la relación coste-efectividad de la implementación de las pruebas farmacogenéticas en la práctica clínica habitual obtendríamos resultados diferentes dependiendo de la población en estudio.

Por todo esto, para la implementación en la práctica clínica normal, parece más lógico el desarrollo de paneles de genes locales.

2. En el momento del reclutamiento existía un aviso de la AEMPS sobre el uso concomitante clopidogrel y el omeprazol, que asociaba el uso concomitante de estos fármacos con una disminución en la eficacia antiagregante del clopidogrel. Posteriormente este aviso se retiró y tras un periodo de controversia al respecto, en la actualidad este aviso se mantiene para el uso del omeprazol, y también para el esomeprazol. Entre nuestros

pacientes, aunque el diseño del estudio no se hizo con este fin, encontramos una tendencia en la asociación entre el tratamiento con IBP y una disminución en la respuesta a clopidogrel.

3. A lo largo de los últimos años, la medicina personalizada se ha convertido en uno de los paradigmas en el ejercicio de la clínica. Observar de manera individualizada la enfermedad, el diagnóstico y así, el tratamiento de los pacientes, convirtiendo a estos en el centro del proceso asistencial, parece constituir la manera más lógica y eficaz de conseguir buenos resultados en salud.

Aunque resulta utópica esta idea de que los pacientes sean el centro de los procesos asistenciales, y por tanto, sean el equipo médico, quienes de manera conjunta teniendo en cuenta todas las variables que puedan afectar a la evolución del pacientes (comorbilidades, tratamientos concomitantes, variables clínicas, situación psicológica y socioeconómica etc.) tomen las mejores decisiones sobre la salud del enfermo; si que se ha conseguido desarrollar áreas de conocimiento que ayuden a largo plazo en este sentido, y que a corto plazo, ya sean útiles en la clínica diaria.

En este sentido, la farmacogenética es una de las áreas de conocimiento que más ha crecido en los últimos años. Al orientar los tratamientos farmacológicos en función de las características genéticas de los pacientes es normal que se haya erigido como unos de los pilares de la medicina personalizada.

De hecho, en los últimos años, el crecimiento de esta ciencia es palpable, no solo en el ámbito investigador, traducido en número de artículos publicados etc. sino en la utilización normal de los medicamentos. Como venimos comentando, existen guías de dosificación basadas en información farmacogenética y tanto FDA como EMA han publicado en los últimos años avisos reflejando la necesidad de genotipar la presencia de algunos

polimorfismos antes de comenzar el tratamiento con algunos fármacos. Incluso, ya son los propios laboratorios quienes en el momento de comercializar algunos medicamentos ya recomiendan realizar este tipo de pruebas a los pacientes.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los individuos diagnosticados de EAP, sometidos a una ATP y tratados con clopidogrel como terapia antiagregante tras la cirugía tienen un mayor riesgo de padecer una re-estenosis del territorio vascular intervenido quirúrgicamente cuando son portadores del SNP *CYP2C19*2* (*c.681G>A*; rs4244285) y/o tienen un genotipo *ABCB1 3435 TT* (*ABCB1 3435C>T*; rs1045642).

2. Los individuos que han padecido un ictus o un accidente isquémico transitorio y que han sido tratados con clopidogrel como terapia antiagregante desde el diagnóstico tienen un mayor riesgo de sufrir de nuevo un ictus o AIT, un infarto agudo de miocardio o muerte cardiovascular cuando son portadores del SNP *CYP2C19*2* (*c.681G>A*; rs4244285).

3. La presencia del SNP *CYP2C19*2* (*c.681G>A*; rs4244285) es un factor predictor de la mala evolución clínica respecto al grado de Fontaine/Rutherford, pletismografía e índice tobillo-brazo, en pacientes con enfermedad arterial periférica, sometidos a una angioplastia transluminal percutánea y tratados con clopidogrel tras la cirugía.

4. Los individuos portadores del SNP *CYP2C19*17* (*c.-806C>T*; rs12248560) que han padecido un ictus o un accidente isquémico transitorio y que han sido tratados con clopidogrel como terapia antiagregante desde el diagnóstico tienen un menor riesgo de padecer la combinada de ictus, accidente isquémico transitorio, infarto agudo de miocardio y muerte cardiovascular.

5. La presencia del alelo *CYP2C19*2* (*c.681G>A*; rs4244285) y/o el genotipo *ABCB1 3435 TT* (Variante *ABCB1 3435C>T*; rs1045642) podrían ser utilizados como predictores de la aparición de eventos isquémicos en pacientes con enfermedad arterial periférica y tratados

con clopidogrel.

6. Nuestros resultados confirman en nuestra población la influencia mostrada por el *SNP CYP2C19*2* (c.681G>A; rs4244285) en la respuesta al clopidogrel en pacientes asiáticos con EAP.

7. Atendiendo a los resultados obtenidos en este trabajo y la evidencia publicada hasta el momento, se puede afirmar que la presencia de un alelo *CYP2C19*2* (c.681G>A; rs4244285) es un marcador de la mala evolución clínica de los pacientes tratados con clopidogrel.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



ANEXOS

ANEXO 1: Aprobación del comité de ética de investigación biomédica de la provincia de Granada para el estudio en pacientes con enfermedad arterial periférica.

Granada a 8 de agosto de 2018

D. Fidel Fernández Quesada, Doctor en Medicina y Cirugía, Especialista en Angiología y Cirugía Vascul ar y Presidente del Comité de Ética de la Investigación Biosanitaria Provincial de Granada:

Certifica que:

D. Xando Díaz Villamarín presentó para evaluación a nuestro comité el proyecto de Investigación denominado:

"Evaluación preliminar de la influencia de la resistencia al Clopidogrel en la evolución postimplante de Stent por Patología Vascul ar periférica" en el año 2013.

Dicho proyecto fue evaluado de forma favorable y aprobada su realización por nuestro comité en el primer trimestre de 2013

Realizo esta certificación a instancias del interesado para ser adjuntada a a la presentación de su tesis doctoral



Fdo: Dr Fidel Fernández Quesada

Presidente del Comité

ANEXO 2: Hoja de información al paciente y consentimiento informado para el estudio en pacientes con enfermedad arterial periférica.

Servicio Farmacia y Servicio Cirugía Vascular H.U.S.C.

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

EN QUE CONSISTE: Los Servicios de Farmacia y Cirugía vascular 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 arteriopatía vascular periférica y 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 BENEFICIARÁ: El hallazgo de una mutación diagnóstica nos permitirá modificar el tratamiento, para conseguir el efecto deseado en la prevención de la enfermedad vascular periférica.

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 nos permitirán 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 Cirugía vascular en el teléfono: 958 023845

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 “Evaluación preliminar de la influencia de la resistencia al clopidogrel en la evolución postimplante de stent por patología vascular periférica”

· He recibido suficiente información sobre el estudio “Evaluación preliminar de la influencia de la resistencia al clopidogrel en la evolución postimplante de stent por patología vascular periférica ”

· 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

· Acepto la utilización de la muestra en futuros proyectos de investigación relacionados o no con la enfermedad o proceso.

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* “Evaluación preliminar de la influencia de la resistencia al clopidogrel en la evolución postimplante de stent por patología vascular periférica ”

Firma del paciente
(O representante legal)

Firma del profesional sanitario

Nombre y apellidos:.....

Nombre y apellidos:.....

Fecha:

Fecha:

ANEXO 3: Aprobación del comité de ética de investigación biomédica de la provincia de Granada para el estudio en pacientes con ictus o accidente isquémico transitorio.



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

DON FRANCISCO JAVIER SALMERÓN ESCOBAR, EN CALIDAD DE PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LA PROVINCIA DE GRANADA,

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado favorablemente, en su reunión celebrada el día 28 de octubre de 2013, el proyecto de investigación titulado: ***Impacto de los polimorfismos cyp2c19 y abcb1 sobre la recurrencia de ictus en pacientes tratados con clopidogrel como terapia antiagregante para la prevención secundaria del ictus en la población andaluza***, siendo el investigador principal el Dr. José Cabeza Barrera 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.

Y que este Comité acepta que dicho proyecto sea realizado en este Centro.

Se recomienda crear un fichero y solicitar a la Gerencia del Centro la declaración del fichero de investigación, de acuerdo con lo establecido en la Ley de Protección de Datos, que hace referencia sólo a los datos personales.

Lo que firmo en Granada, a treinta de octubre de dos mil trece.



Nº 77

HOSPITAL UNIVERSITARIO "San Cecilio"
Avda. Dr. Díaz V. 16. 18012 - GRANADA
Tfno.: 958 02 30 00

ANEXO 4: Hoja de información al paciente y consentimiento informado para el estudio en pacientes con ictus o accidente isquémico transitorio.**DOCUMENTO DE INFORMACION PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIO GENÉTICO DE RESISTENCIA AL CLOPIDOGREL****EN QUE CONSISTE:**

Si a usted le han indicado o ha sido tratado con CLOPIDOGREL como terapia antiagregante en la prevención secundaria de ictus recurrente, le pedimos su autorización para realizarle un estudio genético ya que se ha descrito que el 30% de la población que necesitan tratamiento antiagregante con CLOPIDOGREL tiene una resistencia de origen genético al efecto del fármaco y con un estudio genético específico pretendemos determinar y registrar dicha resistencia

Los estudios genéticos son procedimientos destinados a detectar variaciones en el ADN, que en su caso podría ayudarnos a conocer el efecto específico que provoca el medicamento CLOPIDOGREL en usted.

Los Servicios de Farmacia y Neurología del Hospital _____ en colaboración con el centro de investigación GENYO han diseñado un estudio genético que permite detectar una serie de variaciones en el ADN que, en su caso podría ayudarnos a conocer el efecto específico que provoca el medicamento CLOPIDOGREL en usted

CÓMO 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) o sangre como extracción habitual. El resultado será comunicado a su neurólogo de referencia e incorporado a su historia de salud única.

QUE EFECTOS LE PRODUCIRÁ: Ninguno

EN QUÉ LE BENEFICIARÁ: Es posible que usted directamente no tenga beneficio pero con este estudio pretendemos determinar la posible resistencia al fármaco y su relación con la aparición de ictus que nos permitirá ayudar a otros pacientes en el futuro.

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: La muestra quedará en un banco de muestras y sólo podrá utilizarse para investigar variaciones en el ADN que puedan afectar al efecto antiagregante del medicamento clopidogrel (impacto genético sobre el efecto del clopidogrel y su efecto antiagregante) en ictus, 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 Neurología en los teléfonos: 958 023843 (Granada) o 955 00 91 75 (Sevilla)



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Ouriel K. Peripheral arterial disease. *The Lancet*. 2001;358(9289):1257-64.
2. Serrano Hernando FJ, Martín Conejero A. Enfermedad arterial periférica: aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos. *Revista Española de Cardiología*. 2007;60(9):969-82.
3. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, et al. Mortality over a Period of 10 Years in Patients with Peripheral Arterial Disease. *New England Journal of Medicine*. 1992;326(6):381-6.
4. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*. 1985;71(3):510-5.
5. Hiatt WR, Hoag S, Hamman RF. Effect of Diagnostic Criteria on the Prevalence of Peripheral Arterial Disease. The San Luis Valley Diabetes Study. 1995;91(5):1472-9.
6. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2007;33(1):S1-S75.
7. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA*. 2001;286(11):1317-24.
8. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA*. 2003;290(7):898-904.

9. Hirsch AT, Treat-Jacobson D, Lando HA, Hatsukami DK. The Role of Tobacco Cessation, Antiplatelet and Lipid-Lowering Therapies in the Treatment of Peripheral Arterial Disease. *Vascular Medicine*. 1997;2(3):243-51.
10. Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, et al. 2011 ACCF/AHA Focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline). *Journal of Vascular Surgery*. 2011;54(5):e32-e58.
11. Cole CW, Hill GB, Farzad E, Bouchard A, Moher D, Rody K, et al. Cigarette smoking and peripheral arterial occlusive disease. *Surgery*.114(4):753-7.
12. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, et al. Meta-analysis: Glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*. 2004;141(6):421-31.
13. Kannel WB, Skinner JJ, Schwartz MJ, Shurtleff D. Intermittent Claudication. Incidence in the Framingham Study. 1970;41(5):875-83.
14. Mehler PS, Coll JR, Estacio R, Esler A, Schrier RW, Hiatt WR. Intensive Blood Pressure Control Reduces the Risk of Cardiovascular Events in Patients With Peripheral Arterial Disease and Type 2 Diabetes. *Circulation*. 2003;107(5):753-6.
15. Whitehouse WM, Jr. Cessation of smoking in patients with intermittent claudication. Effects on the risk of peripheral vascular complications, myocardial infarction and mortality. *Journal of Vascular Surgery*.8(5):655.
16. Organization WH. Prevention of cardiovascular disease: World Health Organization; 2007.

17. Fried LP, Borhani NO, Enright P, Furberg CD, Gardin JM, Kronmal RA, et al. The cardiovascular health study: design and rationale. *Annals of epidemiology*. 1991;1(3):263-76.
18. Heart Protection Study Collaborative Group. Randomized trial of the effects of cholesterol-lowering with simvastatin on peripheral vascular and other major vascular outcomes in 20,536 people with peripheral arterial disease and other high-risk conditions. *Journal of Vascular Surgery*. 2007;45(4):645-54.e1.
19. Mondillo S, Ballo P, Barbati R, Guerrini F, Ammaturo T, Agricola E, et al. Effects of simvastatin on walking performance and symptoms of intermittent claudication in hypercholesterolemic patients with peripheral vascular disease. *The American Journal of Medicine*. 2003;114(5):359-64.
20. Östergren J, Sleight P, Dagenais G, Danisa K, Bosch J, Qilong Y, et al. Impact of ramipril in patients with evidence of clinical or subclinical peripheral arterial disease. *European Heart Journal*. 2004;25(1):17-24.
21. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*. 1996;348(9038):1329-39.
22. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324(7329):71-86.
23. Ficha técnica del Ticagrelor. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR__Product_Information/human/001241/WC500100494.pdf
24. Ficha técnica del Prasugrel. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2017/20171220139694/anx_139694_es.pdf.

25. Porter JM, Cutler BS, Lee BY, Reich T, Reichle FA, Scogin JT, et al. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: Multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *American Heart Journal*. 1982;104(1):66-72.
26. Ernst E, Kollár L, Resch KL. Does Pentoxifylline Prolong the Walking Distance in Exercised Claudicants? A Placebo-Controlled Double-Blind Trial. *Angiology*. 1992;43(2):121-5.
27. Beebe HG, Dawson DL, Cutler BS, et al. A new pharmacological treatment for intermittent claudication:: results of a randomized, multicenter trial. *Archives of Internal Medicine*. 1999;159(17):2041-50.
28. Dawson DL, Cutler BS, Meissner MH, Strandness DE. Cilostazol Has Beneficial Effects in Treatment of Intermittent Claudication. Results From a Multicenter, Randomized, Prospective, Double-blind Trial. 1998;98(7):678-86.
29. Cejna M, Thurnher S, Illiasch H, Horvath W, Waldenberger P, Hornik K, et al. PTA versus Palmaz Stent Placement in Femoropopliteal Artery Obstructions: A Multicenter Prospective Randomized Study. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2001;12(1):23-31.
30. Vroegindewij D, Vos LD, Tielbeek AV, Buth J, Bosch HCMvd. Balloon Angioplasty Combined with Primary Stenting Versus Balloon Angioplasty Alone in Femoropopliteal Obstructions: A Comparative Randomized Study. *CardioVascular and Interventional Radiology*. 1997;20(6):420-5.
31. Bedenis R, Lethaby A, Maxwell H, Acosta S, Prins MH. Antiplatelet agents for preventing thrombosis after peripheral arterial bypass surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015(2).

32. Dörffler-Melly J, Büller HR, Koopman MM, Prins MH. Antiplatelet agents for preventing thrombosis after peripheral arterial bypass surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003(3).
33. Ustrell-Roig X, Serena-Leal J. Ictus. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares. *Revista Española de Cardiología*. 2007;60(7):753-69.
34. Hankey GJ, Warlow CP. Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations*. *The Lancet*. 1999;354(9188):1457-63.
35. Rothwell PM, Warlow CP. Timing of TIAs preceding stroke: Time window for prevention is very short. *Neurology*. 2005;64(5):817-20.
36. Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: Final report of the pooling project. *Journal of Chronic Diseases*. 1978;31(4):201-306.
37. Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality: 30 years of follow-up from the framingham study. *JAMA*. 1987;257(16):2176-80.
38. Gofman JW, Young W, Tandy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. *Circulation*. 1966;34(4):679-97.
39. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease: New perspectives based on the framingham study. *Annals of Internal Medicine*. 1979;90(1):85-91.
40. Stamler J, Daviglus ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA*. 2000;284(3):311-8.

41. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CNB, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB, et al. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation*. 2004;110(2):227-39.
42. Barr DP, Russ EM, Eder HA. Protein-lipid relationships in human plasma. *The American Journal of Medicine*. 1951;11(4):480-93.
43. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79(1):8-15.
44. Kannel WB, Dawber TR, McGee DL. Perspectives on systolic hypertension. The Framingham study. *Circulation*. 1980;61(6):1179-82.
45. Lewington S. Prospective Studies Collaboration: Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360:1903-13.
46. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. *The Lancet*. 2000;356(9246):1955-64.
47. Doyle JT, Dawber TR, Kannel WB, Heslin AS, Kahn HA. Cigarette Smoking and Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine*. 1962;266(16):796-801.
48. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, et al. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA*. 2004;292(20):2495-9.
49. Wilson PW, McGee DL, Kannel WB. Obesity, very low density lipoproteins, and glucose intolerance over fourteen years. The framingham study. *American Journal of Epidemiology*. 1981;114(5):697-704.

50. Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *American Journal of Epidemiology*. 1990;132(4):612-28.
51. Wilson PF, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: The framingham experience. *Archives of Internal Medicine*. 2002;162(16):1867-72.
52. Investigators THOPES. Effects of an Angiotensin-Converting–Enzyme Inhibitor, Ramipril, on Cardiovascular Events in High-Risk Patients. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(3):145-53.
53. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *The Lancet*. 2001;358(9287):1033-41.
54. Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *The Lancet*. 2002;359(9311):995-1003.
55. Schrader J, Lüders S, Kulschewski A, Hammersen F, Plate K, Berger J, et al. Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared With Nitrendipine for Secondary Prevention. Principal Results of a Prospective Randomized Controlled Study (MOSES). 2005;36(6):1218-24.
56. Crouse Iii JR, Byington RP, Furberg CD. HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data. *Atherosclerosis*. 1998;138(1):11-24.
57. Ross SD, Allen I, Connelly JE, et al. Clinical outcomes in statin treatment trials: A meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*. 1999;159(15):1793-802.

58. Gorelick PB, Sacco RL, Smith DB, et al. Prevention of a first stroke: A review of guidelines and a multidisciplinary consensus statement from the national stroke association. *JAMA*. 1999;281(12):1112-20.
59. Investigators TSPbARiCL. High-Dose Atorvastatin after Stroke or Transient Ischemic Attack. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(6):549-59.
60. Ringleb PA, Bhatt DL, Hirsch AT, Topol EJ, Hacke W. Benefit of Clopidogrel Over Aspirin Is Amplified in Patients With a History of Ischemic Events. *Stroke*. 2004;35(2):528-32.
61. The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19 435 patients with acute ischaemic stroke. *The Lancet*. 1997;349(9065):1569-81.
62. Chen Z-M. CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20 000 patients with acute ischaemic stroke. *The Lancet*. 1997;349(9066):1641-9.
63. EAFT FT. Secondary prevention in non-rheumatic atrial fibrillation after. *Lancet*. 1993;342:1255-62.
64. Stroke prevention in atrial fibrillation investigators, et al. Adjusted-dose warfarin versus low-intensity, fixed-dose warfarin plus aspirin for high-risk patients with atrial fibrillation: Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III randomised clinical trial. *The Lancet*. 1996;348(9028):633-8.
65. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(16):1240-1.
66. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, et al. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke: The proact ii study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999;282(21):2003-11.

67. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *The Lancet*. 1998;351(9113):1379-87.
68. Trial NASCE. Collaborative Group. The final results of the NASCET trial. *N Engl J Med*. 1998;339:1415-25.
69. Brown M, Rogers J, Bland J. Endovascular versus surgical treatment in patients with carotid stenosis in the Carotid and Vertebral Artery Transluminal Angioplasty Study (CAVATAS): a randomised trial. *The Lancet*. 2001;357(9270):1729.
70. Roubin GS, Yadav S, Iyer SS, Vitek J. Carotid stent-supported angioplasty: a neurovascular intervention to prevent stroke. *American Journal of Cardiology*. 1996;78(3):8-12.
71. Walker MD, Marler JR, Goldstein M, et al. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA*. 1995;273(18):1421-8.
72. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *The Lancet*. 2004;363(9420):1491-502.
73. Lins R, Broekhuysen J, Necciari J, Deroubaix X. Pharmacokinetic profile of ¹⁴C-labeled clopidogrel. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1999;25 Suppl 2:29-33.
74. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos*. 2010;38(1):92-9.

75. Farid NA, Payne CD, Small DS, Winters KJ, Ernest CS, 2nd, Brandt JT, et al. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(5):735-41.
76. Clarke TA, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(1):53-9.
77. Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenetics and genomics.* 2010;20(7):463-5.
78. Investigators CO. Dose comparisons of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. *New England Journal of Medicine.* 2010;363(10):930-42.
79. Ficha técnica del Clopidogrel . Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/71773/71773_ft.pdf.
80. Mehta, S. R., & Yusuf, S. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme. Rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *European Heart Journal.* 2000;21(24):2033-41.
81. 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;352(12):1179-89.
82. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2005;366(9497):1607-21.

83. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet*. 2001;358(9281):527-33.

84. 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;288(19):2411-20.

85. SITE, Hamilton General, et al. Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2006;367(9526):1903-12.

86. Investigators TA. Effect of Clopidogrel Added to Aspirin in Patients with Atrial Fibrillation. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(20):2066-78.

87. Diener H-C, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, et al. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2004;364(9431):331-7.

88. Bhatt DL, Topol EJ. Clopidogrel added to aspirin versus aspirin alone in secondary prevention and high-risk primary prevention: Rationale and design of the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance (CHARISMA) trial. *American Heart Journal*. 2004;148(2):263-8.

89. Méndez J, editor Los genomas eucariotas: aspectos generales. Organización y evolución del genoma eucariota: marcadores moleculares; 1997: Universidade da Coruña.
90. Collins FS, McKusick VA. Implications of the Human Genome Project for medical science. JAMA. 2001;285(5):540-4.
91. Guideline IHT. Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data and Sample Coding Categories E15. 2007.
92. Caldwell J. Pharmacogenetics and individual variation in the range of amino acid adequacy: the biological aspects. The Journal of nutrition. 2004;134(6):1600S-4S.
93. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. Annu Rev Med. 2006;57:119-37.
94. Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. Nature genetics. 1999;22(2).
95. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. science. 2001;291(5507):1304-51.
96. Vogel F, Motulsky III A, Brock D. Human genetics: problems and approaches. Genetical Research. 1997;69(1):75.
97. Estabrook RW. A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). Drug metabolism and disposition. 2003;31(12):1461-73.
98. Omura T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem. 1964;239:2370-8.

99. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2003;43(1):149-73.
100. Seshachar B. 'Mitochondria and Microsomes'. JSTOR; 1982.
101. Nebert DW, Negishi M, Lang MA, Hjelmeland LM, Eisen HJ. The Ah locus, a multigene family necessary for survival in a chemically adverse environment: comparison with the immune system. *Advances in genetics*. 1982;21:1-52.
102. Donato MT. ¿ Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2004.
103. Nebert DW, ADESNIK M, COON MJ, ESTABROOK RW, GONZALEZ FJ, GUENGERICH FP, et al. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *Dna*. 1987;6(1):1-11.
104. Fernández AG, de Sande García MA, Fernández AMM, Ramos SB, Galán MJG. Aspectos fundamentales del Citocromo P450: FUNDACIÓN TEJERINA; 2011.
105. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2008;392(6):1093-108.
106. Disponible en:
<https://www.pharmgkb.org/gene/PA124/clinicalAnnotation>.
107. Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hulot J-S, Thorn CF, Altman RB, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenetics and genomics*. 2012;22(2):159.

108. Desta Z, Zhao X, Shin J-G, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clinical pharmacokinetics*. 2002;41(12):913-58.
109. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;79(1):103-13.
110. de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem*. 1994;269(22):15419-22.
111. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79(1):103-13.
112. Rudberg I, Mohebi B, Hermann M, Refsum H, Molden E. Impact of the ultrarapid CYP2C19*17 allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(2):322-7.
113. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*. 2010;121(4):512-8.
114. Sibbing D, Gebhard D, Koch W, Braun S, Stegherr J, Morath T, et al. Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy. *J Thromb Haemost*. 2010;8(8):1685-93.

115. Gottesman MM, Ling V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research. *FEBS letters*. 2006;580(4):998-1009.
116. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(21):7735-8.
117. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack D, Gottesman M, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(1):265-9.
118. Chandler B, Detsika M, Khoo SH, Williams J, Back DJ, Owen A. Factors impacting the expression of membrane-bound proteins in lymphocytes from HIV-positive subjects. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(3):685-9.
119. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*. 2009;323(5922):1718-22.
120. Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in biochemical sciences*. 1992;17(1):18-21.
121. You G, Morris ME, Wang B. Drug transporters: molecular characterization and role in drug disposition: Wiley Online Library; 2007.
122. Cascorbi I, Haenisch S. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications. *Multi-Drug Resistance in Cancer*. 2010:95-121.
123. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. *Trends in pharmacological sciences*. 2004;25(8):423-9.

124. Consortium GP. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65.
125. Server EV. NHLBI GO exome sequencing project (ESP). 2012.
126. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet*. 2015;54(7):709-35.
127. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C> T affects mRNA stability. *Pharmacogenetics and genomics*. 2005;15(10):693-704.
128. Fung KL, Pan J, Ohnuma S, Lund PE, Pixley JN, Kimchi-Sarfaty C, et al. MDR1 synonymous polymorphisms alter transporter specificity and protein stability in a stable epithelial monolayer. *Cancer research*. 2014;74(2):598-608.
129. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, Johne A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(7):3473-8.
130. Hitzl M, Schaeffeler E, Hocher B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M, et al. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics and Genomics*. 2004;14(5):309-18.

131. Seedhouse CH, Grundy M, White P, Li Y, Fisher J, Yakunina D, et al. Sequential influences of leukemia-specific and genetic factors on p-glycoprotein expression in blasts from 817 patients entered into the National Cancer Research Network acute myeloid leukemia 14 and 15 trials. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(23):7059-66.
132. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave J-P, et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *The Lancet*. 2002;359(9300):30-6.
133. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, et al. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002;71(4):297-303.
134. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(7):e1-e157.

135. Kushner FG, Hand M, Smith SC, King SB, Anderson JL, Antman EM, et al. 2009 Focused Updates: ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction (Updating the 2004 Guideline and 2007 Focused Update) and ACC/AHA/SCAI Guidelines on Percutaneous Coronary Intervention (Updating the 2005 Guideline and 2007 Focused Update). *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. 2009;74(7).

136. 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;360(4):363-75.

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

138. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda LE, Pahl A, Valina CM, et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(20):1925-34.

139. 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;373(9660):309-17.

140. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccchia R, et al. Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. *Am J Cardiol*. 2009;103(6):806-11.

141. 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;30(8):916-22.
142. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA*. 2009;302(8):849-57.
143. Frere C, Cuisset T, Gaborit B, Alessi MC, Hulot JS. The CYP2C19*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost*. 2009;7(8):1409-11.
144. 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;160(3):506-12.
145. 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;80(5):486-501.
146. 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;376(9749):1312-9.
147. 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.

148. 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;8(8):1678-84.

149. Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, et al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet.* 2010;376(9749):1320-8.

150. Guo B, Tan Q, Guo D, Shi Z, Zhang C, Guo W. Patients carrying CYP2C19 loss of function alleles have a reduced response to clopidogrel therapy and a greater risk of in-stent restenosis after endovascular treatment of lower extremity peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2014;60(4):993-1001.

151. Pan Y, Chen W, Xu Y, Yi X, Han Y, Yang Q, et al. genetic Polymorphisms and clopidogrel efficacy for acute ischemic stroke or transient ischemic attack. *Circulation.* 2017;135(1):21-33.

152. Lin YJ, Li JW, Zhang MJ, Qian L, Yang WJ, Zhang CL, et al. The Association Between CYP2C19 Genotype and of In-stent Restenosis Among Patients with Vertebral Artery Stent Treatment. *CNS neuroscience & therapeutics.* 2014;20(2):125-30.

153. Jia D-m, Chen Z-b, Zhang M-j, Yang W-j, Jin J-l, Xia Y-q, et al. CYP2C19 polymorphisms and antiplatelet effects of clopidogrel in acute ischemic stroke in China. *Stroke.* 2013:STROKEAHA. 113.000823.

154. Qiu L-N, Sun Y, Wang L, Han R-F, Xia X-S, Liu J, et al. Influence of CYP2C19 polymorphisms on platelet reactivity and clinical outcomes in ischemic stroke patients treated with clopidogrel. *European journal of pharmacology.* 2015;747:29-35.

155. McDonough CW, McClure LA, Mitchell BD, Gong Y, Horenstein RB, Lewis JP, et al. CYP2C19 metabolizer status and clopidogrel efficacy in the Secondary Prevention of Small Subcortical Strokes (SPS3) study. *Journal of the American Heart Association*. 2015;4(6):e001652.
156. Wang Y, Wang Y, Zhao X, Liu L, Wang D, Wang C, et al. Clopidogrel with aspirin in acute minor stroke or transient ischemic attack. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(1):11-9.
157. Wang Y, Zhao X, Lin J, Li H, Johnston SC, Lin Y, et al. Association between CYP2C19 loss-of-function allele status and efficacy of clopidogrel for risk reduction among patients with minor stroke or transient ischemic attack. *Jama*. 2016;316(1):70-8.
158. Spokoyny I, Barazangi N, Jaramillo V, Rose J, Chen C, Wong C, et al. Reduced clopidogrel metabolism in a multiethnic population: prevalence and rates of recurrent cerebrovascular events. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2014;23(4):694-8.
159. Hoh BL, Gong Y, McDonough CW, Waters MF, Royster AJ, Sheehan TO, et al. CYP2C19 and CES1 polymorphisms and efficacy of clopidogrel and aspirin dual antiplatelet therapy in patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease. *Journal of neurosurgery*. 2016;124(6):1746-51.
160. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(6):538-49.
161. FDA. Disponible en: www.FDA.gov.
162. Zhang S, Lai X, Li W, Jing Z, Xiong Z, Xu A, et al. VASP phosphorylation and genetic polymorphism for clopidogrel resistance in Chinese patients with non-cardioembolic ischemic stroke. *Thrombosis research*. 2014;134(6):1272-7.

163. Sun W, Li Y, Li J, Zhang Z, Zhu W, Liu W, et al. Variant recurrent risk among stroke patients with different CYP2C19 phenotypes and treated with clopidogrel. *Platelets*. 2015;26(6):558-62.
164. Han Y, Lv HH, Liu X, Dong Q, Yang XL, Li SX, et al. Influence of genetic polymorphisms on clopidogrel response and clinical outcomes in patients with acute ischemic stroke CYP2C19 genotype on clopidogrel response. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2015;21(9):692-7.
165. Fang L, Zhao Y, Wang N, Yang Z, Huang H, Lin M. Association of CYP2C19 gene polymorphisms with long-term recurrent risk of ischemic stroke among ethnic Han Chinese from Fujian. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi= Zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Chinese journal of medical genetics*. 2015;32(6):871-6.
166. Li X-Q, Ma N, Li X-G, Wang B, Sun S-S, Gao F, et al. Association of PON1, P2Y12 and COX1 with recurrent ischemic events in patients with extracranial or intracranial stenting. *PloS one*. 2016;11(2):e0148891.
167. Yi X, Wang Y, Lin J, Cheng W, Zhou Q, Wang C. Interaction of CYP2C19, P2Y12, and GPIIIa variants associates with efficacy of clopidogrel and adverse events on patients with ischemic stroke. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2016:1076029616648408.
168. Zhu W-Y, Zhao T, Xiong X-Y, Li J, Wang L, Zhou Y, et al. Association of CYP2C19 polymorphisms with the clinical efficacy of clopidogrel therapy in patients undergoing carotid artery stenting in Asia. *Scientific reports*. 2016;6.
169. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(3):317-23.

170. 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;89(5):662-73.

171. Sanchez-Ramos J, Davila-Fajardo CL, Toledo Frias P, Diaz Villamarin X, Martinez-Gonzalez LJ, Martinez Huertas S, et al. Results of genotype-guided antiplatelet therapy in patients who undergone percutaneous coronary intervention with stent. *Int J Cardiol.* 2016;225:289-95.

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

173. Gómez-Martín A, Hernández AF, Martínez-González LJ, González-Alzaga B, Rodríguez-Barranco M, López-Flores I, et al. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. *Chemosphere.* 2015;139:534-40.

174. Lie YS, Petropoulos CJ. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current opinion in biotechnology.* 1998;9(1):43-8.

175. Disponible en:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/portal/documents/web_content/cms_052013.jpg

176. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/blog/wp-content/uploads/sites/9/2018/05/5taqmanfacts-2.png>

177. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika.* 1965;52(3/4):591-611.

178. Levene H. Robust tests for equality of variances. *Contributions to probability and statistics Essays in honor of Harold Hotelling.* 1961:279-92.

179. Hartl DL, Clark AG, Clark AG. Principles of population genetics: Sinauer associates Sunderland; 1997.
180. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. The Journal of the American College of Dentists. 2014;81(3):14-8.
181. Niu Q, Wang Z, Zhang Y, Wang J, Zhang P, Wang C, et al. Combination use of clopidogrel and proton pump inhibitors increases major adverse cardiovascular events in patients with coronary artery disease: a meta-analysis. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics. 2017;22(2):142-52.
182. Kwok CS, Jeevanantham V, Dawn B, Loke YK. No consistent evidence of differential cardiovascular risk amongst proton-pump inhibitors when used with clopidogrel: meta-analysis. International journal of cardiology. 2013;167(3):965-74.
183. Stockl KM, Le L, Zakharyan A, Harada AS, Solow BK, Addiego JE, et al. Risk of rehospitalization for patients using clopidogrel with a proton pump inhibitor. Archives of Internal Medicine. 2010;170(8):704-10.
184. Kreutz RP, Stanek EJ, Aubert R, Yao J, Breall JA, Desta Z, et al. Impact of proton pump inhibitors on the effectiveness of clopidogrel after coronary stent placement: the clopidogrel Medco outcomes study. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 2010;30(8):787-96.
185. Man M, Farmen M, Dumauval C, Teng CH, Moser B, Irie S, et al. Genetic variation in metabolizing enzyme and transporter genes: comprehensive assessment in 3 major East Asian subpopulations with comparison to Caucasians and Africans. The Journal of Clinical Pharmacology. 2010;50(8):929-40.

186. Mega JL, Simon T, Collet JP, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA*. 2010;304(16):1821-30.

187. 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;56(2):134-43.

188. 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.

189. 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;98(2):100-8.

190. 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;363(18):1704-14.

191. 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;33(17):2143-50.

192. 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;91(2):257-63.