

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

**FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y BIOLOGICAS
“DR. IGNACIO CHAVEZ”**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

LABORATORIO DE HEMOSTASIA Y BIOLOGIA VASCULAR



TESIS

**“PREVALENCIA DE BAJA RESPUESTA A CLOPIDOGREL EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA”**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. MARIA ALEJANDRA TABOADA CORTINA

ASESOR DE TESIS:

D.C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

Morelia, Michoacán Julio 2012

DEDICATORIAS

A Dios por darme el maravilloso don de la vida y por bendecirme día a día.

A mis padres por su incondicional amor, confianza y por impulsarme en todos mis proyectos

A mis hermanos por estar presentes en todos los momentos de mi vida, gracias por sus consejos y apoyo

A toda mi familia, gracias por estar presente en mi vida

A mis amigos que han estado en las buenas y en las malas. ¡Gracias!

A todos los que hicieron posible este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis, D.C. Martha Eva Viveros Sandoval por depositar en mi la confianza de este proyecto, por sus consejos y enseñanzas.

A mi Comité Tutorial: D.C. Ana Edith Higareda Mendoza, D.C. Soledad Vázquez Garcidueñas, D.C. Carlos Arturo Areán Martínez, D.C. Sergio Gutiérrez Castellano, por su compromiso y aportaciones a este trabajo.

A mis profesores por sus enseñanzas y por transmitir esa pasión por la ciencia y la investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular por su amistad y por todos los momentos que compartimos.

A Ana Laura Guillén Nepita y a todos los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana por su amistad, enseñanzas y apoyo. Gracias por contribuir y crear en este trabajo.

A todo el equipo de Hemodinamia del Hospital General Dr. Miguel Silva por su compromiso, responsabilidad y por ser parte del equipo.

Al Dr. Mario Cardiel y al Mat. Carlos Gómez Alonso por las valiosas aportaciones a este trabajo.

A mis compañeros de generación por recorrer este camino juntos y por el apoyo que siempre fueron para mí.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| DEDICATORIAS..... | I |
| AGRADECIMIENTOS..... | II |
| INDICE DE FIGURAS | V |
| INDICE DE TABLAS | VI |
| ABREVIATURAS..... | VII |
| DEFINICIONES..... | IX |
| RESUMEN | 11 |
| 1. ANTECEDENTES..... | 16 |
| 2.1 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR | 16 |
| 2.2 ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA | 17 |
| 2.3 SÍNDROME CORONARIO AGUDO (SCA) | 18 |
| 2.4 INTERVENCIÓN CORONARIA PERCUTÁNEA | 18 |
| 2.5 PLAQUETAS Y SU ROL EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA | 19 |
| 2.6 TERAPIA ANTIPLAQUETARIA | 21 |
| 2.7 FÁRMACOS ANTIPLAQUETARIOS | 22 |
| 2.7.1 <i>Aspirina</i> | 22 |
| 2.7.2 <i>Clopidogrel</i> | 23 |
| 2.8 VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ASPIRINA Y CLOPIDOGREL | 25 |
| 2.9 FACTORES GENÉTICOS | 27 |
| 2.9.1 <i>Polimorfismos del citocromo P450</i> | 27 |
| 2.10 IMPLICACIONES CLÍNICAS A LA VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA AL CLOPIDOGREL | 30 |
| 2.11 MONITOREO DE LA ACTIVIDAD PLAQUETARIA | 30 |
| 2.12 ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE VASP POR CITOMETRÍA DE FLUJO..... | 33 |
| 2 JUSTIFICACION | 36 |
| 3 HIPOTESIS..... | 37 |
| 4 OBJETIVOS | 37 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL..... | 37 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 37 |
| 5 MATERIALES Y METODOS..... | 39 |
| 5.1 SITIO DE ESTUDIO: | 39 |
| 5.2 MUESTRA: | 39 |
| 5.3 TIPO DE ESTUDIO: | 39 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.4 | CRITERIOS: | 40 |
| 5.4.1 | <i>Criterios de inclusión:</i> | 40 |
| 5.4.2 | <i>Criterios de exclusión:</i> | 40 |
| 5.4.3 | <i>Criterios de eliminación</i> | 40 |
| 5.5 | OBTENCIÓN DE MUESTRAS:..... | 41 |
| 5.6 | ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE VASP POR CITOMETRÍA DE FLUJO:..... | 42 |
| 5.7 | EXTRACCIÓN DE ADN:..... | 45 |
| 5.8 | AMPLIFICACIÓN DEL ADN: | 46 |
| 5.9 | DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN:..... | 49 |
| 5.10 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 50 |
| 6 | RESULTADOS | 51 |
| 6.1 | DATOS DEMOGRÁFICOS | 51 |
| 6.2 | DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REACTIVIDAD PLAQUETARIA (IRP) | 53 |
| 6.3 | IDENTIFICACIÓN DEL CYP2C19*2 | 70 |
| 7 | DISCUSION | 77 |
| 8 | RESUMEN DE RESULTADOS | 82 |
| 9 | CONCLUSIONES | 83 |
| 10 | PERSPECTIVAS | 85 |
| 11 | REFERENCIAS | 87 |
| 12 | ANEXOS | 94 |
| 11.1 | MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS | 94 |
| 11.2 | PREPARACIÓN DE SOLUCIONES | 97 |
| 11.3 | FORMATO: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO | 100 |
| 11.4 | APROBACIÓN DE PROTOCOLO. COMITÉ DE ÉTICA. HOSPITAL GENERAL “DR. MIGUEL SILVA” | 101 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Formación de TXA ₂ y otros prostanoides y su inhibición por aspirina. | 22 |
| Figura 2. Mecanismo de acción del Clopidogrel..... | 24 |
| Figura 3. Mecanismos involucrados en la variabilidad de la respuesta a clopidogrel..... | 26 |
| Figura 4. Características del CYP2C19*2..... | 29 |
| Figura 5. Principales pruebas de función plaquetaria..... | 31 |
| Figura 6. Objetivos específicos y estrategia a seguir para lograrlos. | 38 |
| Figura 7. Esquema de la extracción del ADN, amplificación de la secuencia de interés y digestión con enzimas de restricción | 49 |
| Figura 8. Imágenes obtenidas en el citómetro de flujo (BECTON COULTER EPICS ALTRA) de los tres tubos analizados para obtener el IRP. | 54 |
| Figura 9. IRP Toma 1 de los pacientes incluidos en el estudio..... | 55 |
| Figura 10. IRP Toma 2 de los pacientes incluidos en el estudio..... | 56 |
| Figura 11. Distribución de los buenos respondedores y no respondedores en la Toma 1 y Toma 2. 62 | |
| Figura 12. Distribución de buenos respondedores, intermedios y no respondedores en la Toma 1 y Toma 2 | 67 |
| Figura 13. ADN extraído de muestras sanguíneas de los pacientes incluidos en el estudio | 70 |
| Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante PCR de muestras sanguíneas de los pacientes incluidos en el estudio..... | 71 |
| Figura 15. Digestión de los fragmentos amplificados a partir de ADN de muestras sanguíneas de los pacientes incluidos en el estudio. | 72 |
| Figura 16. Efecto del genotipo CYP2C19 en el valor de IRP de la Toma 1 | 75 |
| Figura 17. Efecto del genotipo CYP2C19 en el valor de IRP de la Toma 2 | 76 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Grupos de trabajo que han estudiado la fosforilación de VASP por citometría de flujo y puntos de corte sugeridos que relacionan con ECCVM | 35 |
| Tabla 2. Iniciadores utilizados para determinar el polimorfismo CYP2C19*2 y sus características..... | 48 |
| Tabla 3. Características clínicas de los pacientes. | 52 |
| Tabla 4. Valores promedio de IRP de la Toma 1 y 2 en las diversas variables del estudio. | 58 |
| Tabla 5. Valores promedio de edad, IMC y cuenta plaquetaria en el IRP Toma 1 y 2. | 59 |
| Tabla 6. Resultados de IRP Toma 1, considerando buenos respondedores IRP < 50% y no respondedores IRP ≥ 50%. | 60 |
| Tabla 7. Resultados de IRP Toma 2, considerando buenos respondedores IRP < 50% y no respondedores IRP ≥ 50%. | 60 |
| Tabla 8. Distribución de los pacientes de acuerdo al IRP (<50% y ≥50%) en las distintas variables de estudio y su significancia. | 61 |
| Tabla 9. Distribución de los buenos respondedores y no respondedores en la Toma 1 y Toma 2..... | 63 |
| Tabla 10. Resultados de IRP Toma 1, considerando tres grupos de IRP. | 65 |
| Tabla 11. Resultados de IRP Toma 2, considerando tres grupos de IRP. | 65 |
| Tabla 12. Distribución de los pacientes de acuerdo al IRP (<50%, 50 – 70% y ≥70%) en las distintas variables de estudio y su significancia. | 66 |
| Tabla 13. Distribución de los buenos respondedores, intermedios y no respondedores en la Toma 1 y Toma 2 | 68 |
| Tabla 14. Frecuencia de la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 y valor del IRP. | 74 |
| Tabla 15. Valor promedio de IRP Toma 1 y 2 y la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 | 74 |

ABREVIATURAS

ACTP: Angioplastía coronaria transluminal percutánea

ADP: Difosfato de adenosina

AI: Angina inestable

COX: Ciclooxygenasa

EAC: Enfermedad arterial coronaria

ECCVM: Eventos cardio cerebro vasculares mayores.

ECV: Enfermedades cardiovasculares

FL1 LOG: Medida logarítmica de la emisión de fluorescencia para cuantificar la intensidad de FITC unido al VASP-P.

FL2 LOG: Medida logarítmica de la emisión de fluorescencia para detectar la unión de CD61-PE y por tanto identificar específicamente la población plaquetaria.

FS LOG: Medida logarítmica de la dispersión frontal (FS). Eje de las Y. Indica tamaño celular.

IAM: Infarto agudo al miocardio

IAMEST: Infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST

IAMSEST: Infarto agudo al miocardio sin elevación del segmento ST

ICP: Intervención coronaria percutánea

SCA: Síndrome coronario agudo

SS LOG: Medida logarítmica de la dispersión lateral de la luz (SS). Eje de las X. Indica complejidad celular.

TAX2: Tromboxano A2

DEFINICIONES

Angina de pecho: Dolor torácico debido a una deficiente provisión de sangre al músculo del corazón.

Angina estable: Se define como la molestia torácica de características anginosas causada por isquemia miocárdica inducida por el ejercicio y asociado con un disturbio de la función miocárdica, sin llegar a presentar necrosis.

Angina inestable: (AI) Se define como un síndrome clínico transitorio, que varía sus límites, entre la angina crónica estable y el infarto agudo de miocardio, en su mayoría correspondiente a pacientes con enfermedad coronaria. Se caracteriza por ser un proceso que implica la ruptura de una placa aterosclerótica, lo cual desencadena una cascada de eventos fisiopatológicos que llevan a la formación de trombo intracoronario y a la oclusión parcial o total del vaso, comprometiendo la irrigación de la zona miocárdica relacionada.

Angiografía coronaria: (Coronariografía) Es un procedimiento en el que se utiliza un tinte especial (material de contraste) y rayos X para observar la forma como fluye la sangre a través del corazón.

Angioplastia coronaria: (Intervención coronaria percutánea) Es un procedimiento para abrir vasos sanguíneos estrechos o bloqueados que le suministran sangre al corazón. Generalmente, se coloca un pequeño tubo de malla metálica llamado *stent* al mismo tiempo.

Aterosclerosis: El endurecimiento de las arterias, también llamado aterosclerosis, es un trastorno común que ocurre cuando se acumula grasa, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias y forman estructuras duras llamadas placas.

Dislipidemia: Alteración en el patrón lipídico. En el presente trabajo se consideró como dislipidemia si presentaba alguno de los siguientes: hipercolesterolemia (>200 mg/dL), hipertrigliceridemia (>150 mg/dL), descenso del cHDL (<40 mg/dL), aumento del cLDL (>130 mg/dL)

Enfermedad arterial coronaria (EAC): Es el tipo más común de enfermedad cardíaca. Es una afección en la que la placa se deposita dentro de las arterias coronarias provocando su estrechamiento y endurecimiento, impidiendo así que éstas suministren sangre rica en oxígeno al corazón.

Evento cardio cerebro vascular mayor (ECCVM): Término que refiere la presencia de: muerte cardiovascular, trombosis del stent, re infarto, re vascularización, embolia o derrame cerebral.

Infarto agudo al miocardio (IAM): Se presenta cuando se bloquea el flujo sanguíneo a una parte del corazón por un tiempo suficiente para que esa parte del miocardio sufra daño o muera.

Infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST (IAMEST): Tipo de IAM clasificado de acuerdo a las alteraciones observadas en el electrocardiograma. Dicha alteración es la elevación del segmento ST, lo cual indica que se ha lesionado una gran cantidad de músculo cardíaco. El IAMEST es el tipo más grave de IAM en donde la arteria coronaria está completamente obstruida por un coágulo sanguíneo, de modo que todo el músculo cardíaco que normalmente recibe sangre de la arteria afectada comienza a morir.

Infarto agudo al miocardio sin elevación del segmento ST: (IAMSEST) Tipo de IAM en donde la arteria coronaria solo está parcialmente obstruida, de modo que solo puede lesionarse una parte del músculo cardíaco regado por la arteria afectada. Un IAMSEST no produce elevación del segmento ST en el electrocardiograma.

Síndrome coronario agudo: (SCA) Conjunto de entidades producidas por la erosión o rotura de una placa de ateroma, que determina la formación de un trombo intracoronario, causando una angina inestable (AI), infarto agudo al miocardio (IAM) o muerte súbita, según la cantidad y duración del trombo, la existencia de circulación colateral y la presencia de vasoespasmos en el momento de la rotura.

Trombosis: Situación vascular anormal en la que se desarrolla un trombo en el interior de un vaso sanguíneo.

RESUMEN

“Prevalencia de baja respuesta a Clopidogrel en pacientes con Enfermedad Arterial Coronaria”

Taboada MA¹, Areán C², Gutiérrez S¹, Marin G¹, García N¹, Solorio R², Viveros ME¹
¹*División de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez,*

UMSNH

²*Hospital General Dr. Miguel Silva, Morelia Mich.*

Introducción: La Intervención Coronaria Percutánea (ICP) es la terapia de elección para la revascularización en la Enfermedad Arterial Coronaria, ocasionada generalmente por la aterosclerosis. Unida a la ICP, la terapia antiplaquetaria por inhibición del receptor de ADP P2Y12 mediante Clopidogrel ha reducido la incidencia de eventos adversos cardio-cerebrovasculares-mayores (ECCVM). Sin embargo existe un grupo de pacientes que presentan baja respuesta a Clopidogrel, identificados como “no respondedores”. Esta variabilidad puede deberse a factores celulares, clínicos y genéticos; dentro de éstos últimos se ha estudiado los polimorfismos en la familia del citocromo P450, enzimas que se encargan de la biotransformación de fármacos. Destaca el estudio de la isoforma CYP2C19, enzima que participa en los dos pasos de la transformación del Clopidogrel en su metabolito activo; y su defecto CYP2C19*2, que su presencia está relacionada con un fenotipo de una pobre metabolización del fármaco. Existen varios métodos para evaluar la función plaquetaria, dentro de los cuales el análisis de la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) mediante citometría de flujo permite evaluar el grado de inhibición del receptor P2Y12 y por tanto la eficacia del Clopidogrel determinando del Índice de Reactividad Plaquetaria (IRP). Este es el primer estudio de determinación de IRP mediante análisis VASP/P2Y12 por citometría de flujo en Latinoamérica.

Hipótesis: Existe variación interindividual a Clopidogrel en población mexicana y ésta se relaciona con la presencia del polimorfismo CYP2C19*2.

Objetivo: Determinar la prevalencia de baja respuesta a Clopidogrel y su relación con la presencia de CYP2C19*2 en pacientes sometidos a ICP mediante análisis de actividad plaquetaria.

Métodos: Estudio experimental, prolectivo y longitudinal. Se incluyeron en el estudio 90 pacientes con EAC sometidos a angiografía coronaria o ICP. Se determinó el IRP mediante el ensayo VASP (PLATELET VASP/P2Y12 Biocytex, France) en citómetro de flujo (Beckman Coulter Epics Altra). La baja respuesta a Clopidogrel se definió como un IRP $\geq 50\%$ posterior a dosis de carga de 600 mg (Bonello L, 2010). Se tomaron dos muestras para análisis: Toma 1: a las seis y ocho horas post administración de la dosis de carga previo a la ICP y Toma 2: a las 24 horas post ICP. Se determinó la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 mediante la extracción del ADN por método convencional de fenol – cloroformo, la amplificación del producto por PCR y la digestión por enzima de restricción SmaI.

Resultados: Noventa pacientes: 71 hombres (79%) y 19 mujeres (21%), media de edad 63.2 ± 9.8 años. 60% en la Toma 1 y 56.7% en la Toma 2 mostraron un IRP $\geq 50\%$. Se observó que 35.4% de los pacientes no presentaron el mismo comportamiento durante las dos tomas ($p=0.028^*$). Se sugirió una subclasificación de los pacientes con un IRP $\geq 50\%$, donde un IRP mayor del 50% pero menor del 70% se consideraron *Alta Reactividad Plaquetaria En Tratamiento (ARPET)* y con un IRP $\geq 70\%$ se clasificaron como “no respondedores”. De acuerdo a esto se obtuvo que: 38% en la Toma 1 y 28% en la Toma 2 fueron ARPET y 22% en la Toma 1 y 30% en la Toma 2 fueron considerados “no respondedores”. Se observó 4.4% de ECCVM. Se estudió la presencia de CYP2C19*2 de 51 pacientes, encontrándose ausencia de éste (GG) en el 82.4% y presencia (GA/AA) en 17%. Los pacientes que presentaron el polimorfismo CYP2C19*2 de forma homocigota presentaron un IRP $\geq 50\%$. La media del IRP en los pacientes con ausencia de CYP2C19*2 (GG) fue de $57.3\% \pm 21.55$ (DE) en la Toma 1 y $62.46\% \pm 19.65$ (DE) en la Toma 2. La media del IRP en los pacientes con presencia del polimorfismo CYP2C19*2 (GA/AA) fue de $52.4\% \pm 31.8$ (DE) en la Toma 1 y $64.3\% \pm 21.8$ (DE) en la Toma 2. ($p>0.005$).

Conclusiones: Se observa un alto porcentaje de pacientes con un IRP $\geq 50\%$ en población mexicana, sin embargo éste no se relaciona con el número de ECCVM, ya que en esta población éstos fueron muy bajos. La determinación del Índice de Reactividad Plaquetaria mediante el ensayo VASP/P2Y12 por citometría de flujo, permite la identificación de pacientes con baja respuesta al Clopidogrel que precisen de ajuste en la dosis o cambio de antiplaquetario con el fin de prevenir eventos adversos. El porcentaje de la presencia de CYP2C19*2 en la población estudiada fue baja, por lo que este polimorfismo no es la única variación genética responsable de la no respuesta al Clopidogrel. Sin embargo, la presencia de la mutación homocigota CYP2C19*2 (AA) sugiere fuertemente una baja respuesta a Clopidogrel. Se requiere de más estudios de otras variantes genéticas que también puedan contribuir a la respuesta inadecuada a este antiplaquetario.

ABSTRACT

"Prevalence of Clopidogrel low response in patients with coronary artery disease"

Taboada MA¹, Areán C², Gutiérrez S¹, Marin G¹, García N¹, Solorio R², Viveros ME¹
¹*División de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez, UMSNH*

²*Hospital General Dr. Miguel Silva, Morelia Mich.*

Introduction: The percutaneous coronary intervention (PCI) is the therapy of choice for revascularization in coronary artery disease (CAD), usually caused by atherosclerosis. Attached to the PCI, antiplatelet therapy by inhibition of P2Y₁₂ ADP receptor by clopidogrel reduce the incidence of major cardiovascular adverse events (MACE). However, there is a group of patients with low response to clopidogrel, identified as "nonresponders." This variability may be due to cellular, clinical and genetic factors. Genetic polymorphisms in hepatic enzymes that are responsible for the biotransformation of the drug, particularly in the cytochrome P450 family have been study. Polymorphisms in CYP2C19 isoenzyme (particularly the loss of function cytochrome CYP2C19*2 variant) have accounted for Clopidogrel nonresponse in patients with ischaemic heart disease. There are several methods to assess platelet function. The analysis of the phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by flow cytometry, evaluates the degree of inhibition of the P2Y₁₂ receptor and thereby determine the Platelet Reactivity Index (PRI) as a measure of effectiveness of Clopidogrel This is the first study of determination of IRP by VASP/P2Y₁₂ analysis by flow cytometry in Latin America

Hypothesis: There is interindividual variation of Clopidogrel in Mexican population and this is related to the presence of CYP2C19 * 2 polymorphism.

Objective: To determine the prevalence of Clopidogrel low response and its relation to the presence of CYP2C19 * 2 in patients undergoing PCI by the analysis of platelet activity.

Method: Experimental, prospective and longitudinal. The present study was performed in 90 patients with CAD undergoing PCI. The PRI-VASP (Platelet VASP/P2Y₁₂ Biocytex, France) was determined by flow cytometry (Coulter Epics Altra Beckman). The low response to clopidogrel was defined as a PRI \geq 50% after loading dose of 600 mg (Bonello L, 2010). Two samples for analysis: Take 1: a six to eight hours after administration of the loading dose before PCI and Take 2: 24 hours post PCI. We determined the presence of the polymorphism CYP2C19 * 2 by extracting the DNA by conventional method of phenol - chloroform, the amplified product by PCR and digested by restriction enzyme SmaI.

Results: Ninety patients: 71 men (79%) and 19 women (21%), mean age 63.2 ± 9.8 years. 60% patients in Take 1 and 56.7% in the Take 2 showed a PRI-VASP $\geq 50\%$. It was observed that 35.4% of patients did not show the same behavior for both doses ($p = 0.028$ *). It was suggested a subclassification of patients with PRI-VASP $\geq 50\%$, where an PRI-VASP greater than 50% but less than 70% were considered High on Treatment Platelet Reactivity (HTPR) and an PRI $\geq 70\%$ were classified as "nonresponders". Accordingly it was found that: 38% in Take 1 and 28% in Take 2 were HTPR and 22% in Take 1 and 30% in Take 2 were considered "nonresponders". In 4.4% of the patients MACE were observed. We studied in 51 patients the presence of CYP2C19*2, finding its absence (GG) in 82.4% and presence (GA / AA) in 17%. Patients with CYP2C19*2 polymorphism homozygous form showed a PRI-VASP $\geq 50\%$. The patients with polymorphism CYP2C19*2 (AA) showed a PRI-VASP $\geq 50\%$. The mean PRI-VASP in patients without CYP2C19*2 (GG) was $57.3\% \pm 21.55$ (SD) in Take 1 and $62.46\% \pm 19.65$ (SD) in Take 2. The mean PRI-VASP in patients with the polymorphism CYP2C19*2 (GA / AA) was $52.4\% \pm 31.8$ (SD) in Take 1 and $64.3\% \pm 21.8$ (SD) in Take 2. ($p > 0.005$).

Conclusions: There is a high percentage of patients with PRI-VASP $\geq 50\%$ in Mexican population, however it is not related to the number of MACE, because in this population they were very low. Determination of Platelet Reactivity Index by testing phosphorylation of VASP/P2Y12 by flow cytometry allows the identification of patients with low response to clopidogrel who require dose adjustment or change of antiplatelet to prevent adverse events. The percentage of the presence of CYP2C19 * 2 in the study population was low, so that this polymorphism is not the only genetic variation responsible for the non-response to clopidogrel. However, the presence of the mutation homozygous CYP2C19 * 2 (AA) strongly suggests a low response to clopidogrel. We need more studies of other genetic variants that may also contribute to inadequate response to this antiplatelet.

INTRODUCCIÓN

El uso de Clopidogrel y Aspirina en pacientes sometidos a Intervención Coronaria Percutánea (ICP) ha podido reducir de manera significativa los eventos cardiovasculares. Sin embargo, hay algunos pacientes que a pesar de llevar el tratamiento antiplaquetario de manera correcta, presentan eventos isquémicos. En diversos estudios se habla de una gran variabilidad a la respuesta al Clopidogrel. En diferentes estudios se han descrito distintos rangos de no respuesta al Clopidogrel que van del 5 al 46%. Sin embargo en población mexicana se desconoce este porcentaje. Por todo ello, la monitorización de la actividad plaquetaria en pacientes bajo tratamiento antiplaquetario se ha visto necesario para así poder identificar al grupo de “no respondedores” ya que estos pacientes tienen un mayor riesgo de presentar eventos cardio-cerebrovasculares mayores (ECCVM).

Hay varios métodos para determinar la reactividad plaquetaria. La determinación de la fosforilación de VASP/P2Y12 por citometría de flujo ha demostrado gran especificidad para medir la respuesta a la terapia antiplaquetaria con tienopiridinas como el Clopidogrel, al medir el grado de inhibición del receptor plaquetario P2Y12 por el fármaco.

La variabilidad que existe a la respuesta al Clopidogrel puede deberse a diversos factores clínicos, celulares y genéticos. Dentro de éstos últimos se ha investigado en los últimos años la relación que tienen las enzimas de la familia del citocromo P450 (enzimas responsables de la transformación del Clopidogrel en su metabolito activo), específicamente la isoenzima CYP2C19, con los pacientes que presentan pobre respuesta al Clopidogrel.

1. ANTECEDENTES

2.1 *Enfermedad Cardiovascular*

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de morbi - mortalidad en México y en el mundo. En nuestro país, las enfermedades del corazón son en conjunto la primera causa de mortalidad general (Velázquez Monroy O, 2007).

Las ECV se refieren a las enfermedades que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos. Estas pueden ser: enfermedad arterial coronaria (EAC), enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica, cardiopatía reumática o congénita, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Los malos hábitos alimenticios, el incremento del consumo de sodio, alcohol, tabaco y sedentarismo, situaciones frecuentes tanto en países industrializados como en países en vías en desarrollo, son los principales factores de riesgo de estas enfermedades. (Velázquez Monroy O, 2007).

En el 2008 el Sistema Nacional de Salud reporta a la enfermedad arterial coronaria y a la enfermedad cerebro vascular como la segunda y la tercera causa de mortalidad general respectivamente. En el 2008, último año del que se dispone de datos de ámbito nacional, las ECV causaron 90 000 muertes, de las cuales la enfermedad arterial coronaria fue responsable de 60 000 defunciones. (Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS <http://www.sinais.salud.gob.mx>, 2012)

2.2 Enfermedad arterial coronaria

La EAC es el tipo más común de enfermedad cardiovascular. La causa más frecuente de la alteración de las arterias coronarias es la aterosclerosis, que se produce por el depósito de sustancias en el interior del vaso sanguíneo en forma de placas de ateroma que reducen la luz de la arteria, por lo cual se disminuye el flujo de sangre que la arteria puede transportar al corazón haciendo insuficiente el suministro de oxígeno a este músculo, manifestándose así la EAC o cardiopatía isquémica. (Badimon L V. G., 2009) La aterosclerosis afecta principalmente a las arterias que irrigan al corazón (coronarias), el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales) y las extremidades inferiores (iliacas y femorales). Sus manifestaciones clínicas dependen del lecho vascular afectado. En las coronarias se manifiesta por la aparición de síndrome coronario agudo (SCA), infarto agudo de miocardio (IAM) o muerte súbita. En cuanto a la forma de presentación puede ser crónica, por estenosis de la luz arterial, como en la angina estable o la claudicación intermitente, o aguda, por la súbita rotura de la placa y la formación de un trombo, como ocurre en los SCA. (Lahoz C, 2007) Las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis son consecuencia de las complicaciones trombóticas debidas al rompimiento de la placa de ateroma. De esta manera, el término aterotrombosis incluye a los dos componentes principales (aterosclerosis y trombosis) en la patogenia de las ECV. (Ibanez B, 2007)

Los principales factores de riesgo de aterosclerosis son: tabaco, hipertensión arterial, dislipidemia, diabetes mellitus, edad avanzada, obesidad, inactividad física, historia familiar de cardiopatía isquémica, características étnicas, factores psicosociales y factores socioeconómicos. (Lahoz C, 2007)

2.3 Síndrome coronario agudo (SCA)

Se le llama SCA a las variadas presentaciones agudas de la enfermedad coronaria debido a la presencia de un trombo que se ha formado por la ruptura de la placa de ateroma. Éstas pueden ser: la muerte súbita de origen coronario, IAM y la angina inestable. El IAM se clasifica según sus manifestaciones electrocardiográficas en IAM con elevación del segmento ST (IAMEST) e IAM sin elevación del segmento ST (IAMSEST). (Florenzano, 2000) (Jerjes-Sanchez Díaz C, 2006) El segmento ST se eleva (por encima de la línea isoeleétrica) cuando el corazón recibe un aporte de oxígeno insuficiente. (Tortora G, 2006)

2.4 Intervención coronaria percutánea

La Intervención Coronaria Percutánea (ICP) o angioplastia coronaria es una valiosa herramienta en el tratamiento de revascularización de los pacientes que presentan SCA (Silber S, 2005), cuyo objetivo es desobstruir las arterias coronarias y restaurar el flujo sanguíneo.

Para detectar con certeza las obstrucciones coronarias se realiza un estudio especializado que se conoce como coronariografía o angiografía coronaria, que da información precisa del sitio de la lesión u obstrucción y así poder tratar la arteria coronaria afectada. Al determinar la lesión, se hace pasar un catéter con un balón en la punta desde la arteria femoral o radial hasta llegar a la zona afectada en la arteria del corazón (esto se conoce como angioplastia coronaria transluminal percutánea o ACTP). Luego, el balón se infla, comprime la placa y ensancha la arteria coronaria obstruida para que la sangre pueda fluir con más facilidad. Con frecuencia, se acompaña de la implantación de una endoprótesis vascular (stent) metálica expandible.

Las endoprótesis vasculares (stents) son tubos de malla metálica que se usan para mantener las arterias abiertas después de una ACTP. (Silber S, 2005)

Sin embargo, la rotura de la placa aterosclerótica coronaria, ya sea de manera espontánea o inducida (al ensanchar la luz vascular en la ICP) provoca una lesión en el endotelio exponiendo componentes de la matriz vascular que inducen a la activación de, las plaquetas circulantes creando un ambiente protrombótico. (Badimon L, 2008)

2.5 Plaquetas y su rol en la fisiopatología de la Enfermedad Arterial Coronaria

Sin duda, las plaquetas juegan un importante rol en la hemostasia y en la trombosis. Estas células sanguíneas originadas en la médula ósea a partir de fragmentos de la membrana del megacariocito, circulan en sangre periférica en forma de disco aproximadamente entre 9 y 12 días (tiempo de vida media) y miden en promedio de 2 a 4 micras de diámetro y 0.6 a 1.3 micras de grosor. Son células anucleadas carentes de ADN que poseen carga eléctrica negativa en su superficie y su concentración normal en la sangre es de 150 a $450 \times 10^9/L$. (Badimon L V. G., 2009) (Martínez Murillo C., 2008)

Las plaquetas poseen una membrana formada de una capa lipoproteica con glucoproteínas que funcionan como receptores de agonistas fisiológicos tales como ADP, TXA₂, trombina; proteínas adhesivas como fibrinógeno, fibronectina, FvW y para ligandos fibrosos como colágeno.

Las plaquetas realizan un papel fundamental en la hemostasia primaria. Cuando se lesiona el endotelio se desencadena una serie de mecanismos hemostáticos cuya finalidad es cesar la

hemorragia formando primeramente un tapón plaquetario que posteriormente será estabilizado por la fibrina.

Al ocurrir una lesión en el vaso sanguíneo, el colágeno del subendotelio queda expuesto y aumenta la atracción de las plaquetas hacia él. Por otro lado, existe una vasoconstricción que ocasiona una disminución del flujo sanguíneo y permite también una mayor interacción de las plaquetas con el endotelio. A este mecanismo se le conoce con el nombre de **adhesión**.

Existen diferentes sustancias conocidos como *agonistas plaquetarios* que activan a las plaquetas desencadenando una serie de reacciones para una respuesta adecuada ante la lesión del vaso sanguíneo. Durante la **activación plaquetaria**, las plaquetas sufren un cambio de forma: de una forma discoide a una forma más redondeada con pseudópodos delgados que facilitan aún más la adhesión plaquetaria. Algunos estímulos fisiológicos para la **activación plaquetaria** son el factor VonWillebrand (FvW), trombina, colágeno, ADP, epinefrina, tromboxano A₂, etc. En la siguiente fase, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (anteriormente llamada GPIIb-IIIa) localizada en la superficie de la plaqueta, juega un papel fundamental para la **agregación plaquetaria primaria** al unirse al fibrinógeno y al calcio y permitir la unión con todas las plaquetas. En el interior de la plaqueta también sucede un mecanismo de activación que finalmente provoca la liberación de agonistas contenidos en los gránulos α intraplaquetarios y amplifican las reacciones de agregación favoreciendo la **agregación plaquetaria secundaria**. De esta manera se forma un tapón plaquetario que cesa momentáneamente la lesión del vaso sanguíneo. Posteriormente este tapón es estabilizado con la fibrina y se forma el coágulo sanguíneo. (Martínez Murillo C., 2008) (Puddu P, 2009)

Las plaquetas también desempeñan un papel fundamental en las complicaciones aterotrombóticas que sufren los pacientes con enfermedad coronaria y en aquéllos tratados con intervencionismo coronario percutáneo (ICP). Cuando se rompe una placa de ateroma, se inician los procesos de adhesión, activación y agregación plaquetaria que dan lugar a la trombosis. De ahí que la terapia antiplaquetaria, sea la piedra angular en el tratamiento de los pacientes con SCA y en la ICP para evitar eventos isquémicos posteriores. (Angiolillo D, 2010)

2.6 Terapia antiplaquetaria

La formación de trombos coronarios, es el proceso que desencadena los síntomas de los síndromes coronarios agudos (Arzamendi D, 2006). A su vez, la lesión que provoca la propia intervención coronaria percutánea es un potente estímulo para la activación de las plaquetas y de la coagulación. Es por esto que los fármacos antiplaquetarios desempeñan un papel fundamental en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos y en los pacientes sometidos al intervencionismo percutáneo (Fernández-Ortiz A, 2006). Los fármacos antiagregantes empleados con mayor frecuencia en el tratamiento y la prevención de las complicaciones de las enfermedades cardiovasculares son la aspirina y el clopidogrel, frecuentemente usados ambos en terapia combinada para lograr una mayor inhibición plaquetaria. (Antonio de Miguel, 2008)

2.7 Fármacos antiplaquetarios

2.7.1 Aspirina

El ácido araquidónico, que es liberado de las membranas lipídicas, es convertido por acción de las enzimas ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2 (COX-1 y COX-2) en Prostaglandina G₂, la cual conduce a la formación de Tromboxano A₂ (TXA₂), potente agonista plaquetario que induce la secreción de los gránulos de la plaqueta y su agregación (Arzamendi D, 2006) como lo muestra la figura 1. La aspirina actúa inhibiendo de manera irreversible y durante toda la vida de la plaqueta a la COX-1, y por tanto, reduce la producción plaquetaria de TXA₂.

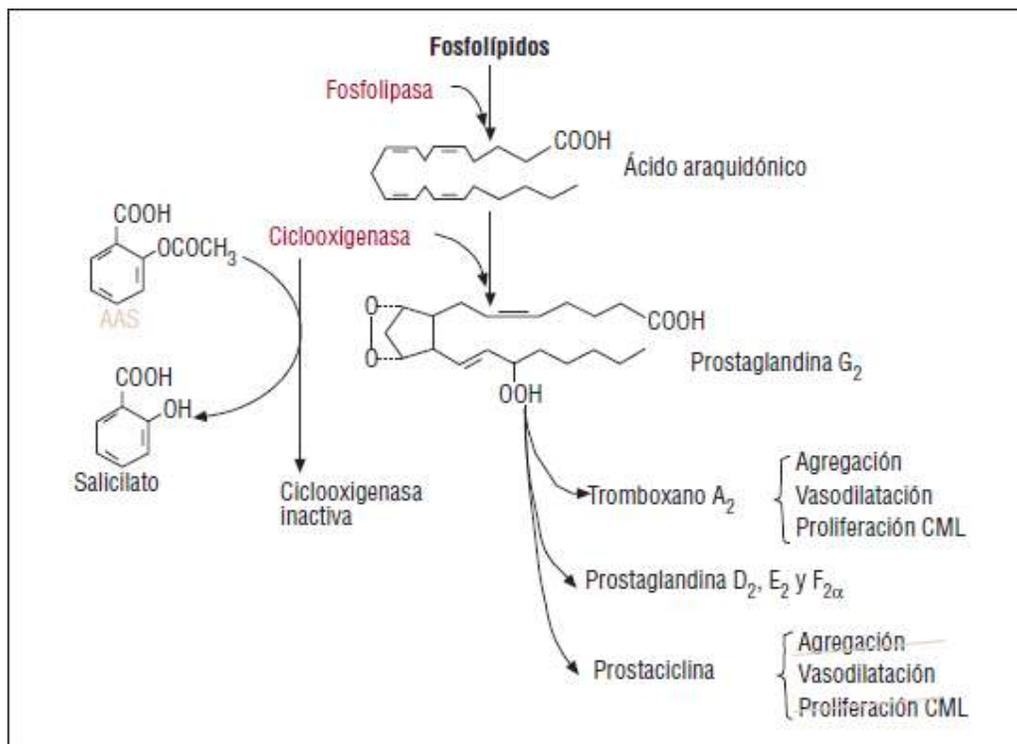


Figura 1. Formación de TXA₂ y otros prostanoides y su inhibición por aspirina.

AAS: ácido acetilsalicílico. (Arzamendi D, 2006)

2.7.2 Clopidogrel

Como se mencionó anteriormente, el ADP es un importante agonista secundario liberado de los gránulos densos de las plaquetas activadas por agonistas primarios (Factor tisular, Trombina, Colágeno, Tromboxano A₂) provocando así una respuesta amplificada en la activación plaquetaria. P2Y₁₂ es uno de los dos receptores para ADP que juega un importante papel en la patogenia de la trombosis, ya que media la agregación plaquetaria inducida por ADP, la estabilización del coágulo plaquetario mediada por trombina y la inhibición de los efectos antiplaquetarios naturales de la prostaciclina. Por todas estas características hacen de este receptor un atractivo blanco para la terapia antiplaquetaria. (Cattaneo, 2011)

El clopidogrel es una tienopiridina de segunda generación que se hidroliza en aproximadamente un 85% por esterasas de la sangre lo que da lugar a la formación de metabolitos inactivos, mientras que solo el 15% sufre de una biotransformación hepática mediante el sistema del citocromo P450 (CYP) para dar lugar a su metabolito activo, el cual se une irreversible y selectivamente al receptor plaquetario del ADP P2Y₁₂. La unión de ADP al receptor P2Y₁₂ acoplado a G_i libera las subunidades α_i y βγ de la proteína G_i y da lugar a la estabilización de la agregación plaquetaria. La subunidad α_i inhibe la adenililciclase (AC) y, por lo tanto, reduce las concentraciones de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc), lo cual reduce la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP-P). El estado de la VASP modula la activación del receptor de glucoproteína (GP) IIb/IIIa. La prostaglandina E1 (PGE1) activa la AC, que aumenta las concentraciones de AMPc y el estado de la VASP-P (Angiolillo D, Ferreiro JL, 2010).

De esta manera, debido a sus diferentes mecanismos de acción: la inhibición de la formación de tromboxano en plaqueta y de prostaciclina en el endotelio vascular, por parte de la aspirina y la inhibición de los receptores plaquetarios del ADP, por parte del clopidogrel, el uso combinado de estos medicamentos logra un mayor grado de inhibición de la agregación plaquetaria y se ha convertido en la terapia farmacológica de elección para tratar SCA y en pacientes sometidos a ICP como se muestra en la figura 2. (Altman R, 2010) (Antonio de Miguel, 2008).

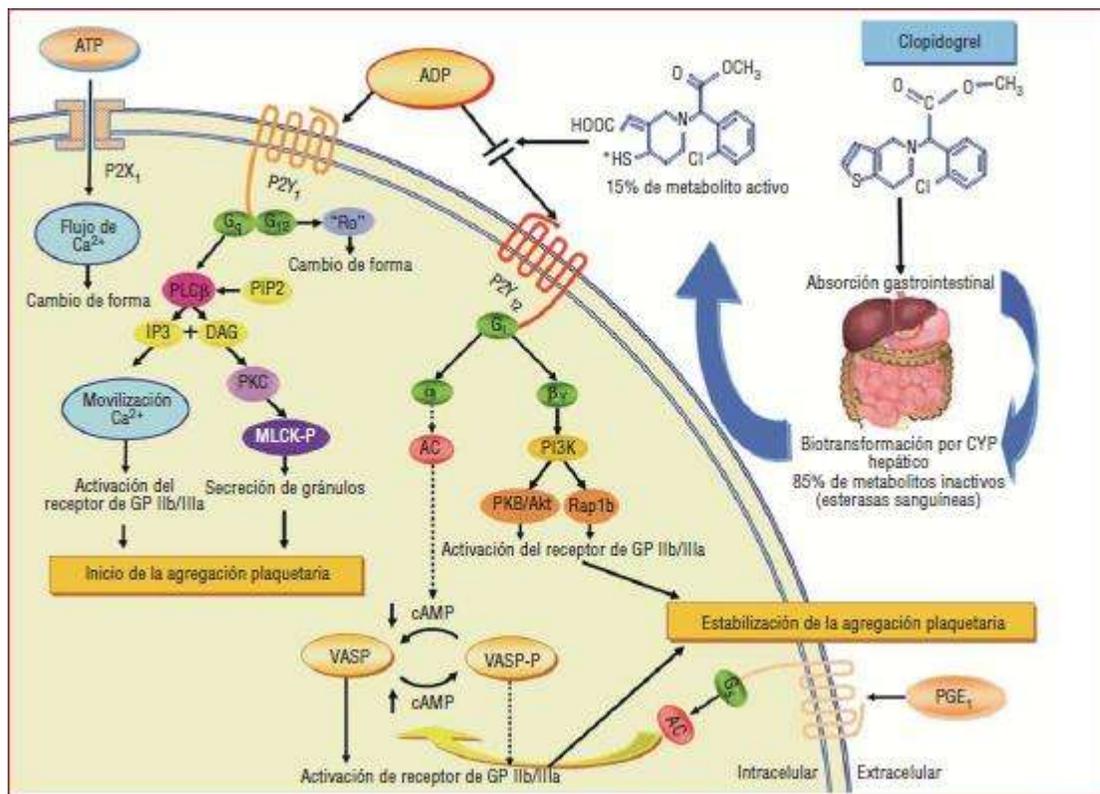


Figura 2. Mecanismo de acción del Clopidogrel.

Su metabolito activo se une de forma irreversible al receptor P2Y12 impidiendo la activación de GP IIb/IIIa y por tanto la estabilización de la agregación plaquetaria. (Angiolillo D, Ferreiro et al, 2010)

2.8 Variabilidad en la respuesta al tratamiento con Aspirina y Clopidogrel

A pesar de los efectos beneficiosos que muestra el clopidogrel en el tratamiento y en la prevención de las complicaciones de la enfermedad arterial coronaria, presenta limitaciones, la más relevante es la amplia variabilidad que existe en la respuesta inhibitoria plaquetaria. Es decir, no todos los pacientes responden de la misma manera al tratamiento antiagregante del Clopidogrel, y hay pacientes que sufren efectos adversos cardiovasculares a largo plazo a pesar de seguir el tratamiento correctamente. (Antonio de Miguel, 2008)

Existe un porcentaje relativamente alto de pacientes que muestran unos efectos subóptimos, lo que se ha hecho que se acuñara para ellos los términos de “pobres respondedores” o “resistentes”.

Sin embargo, este concepto de “resistencia” se ha ampliado últimamente en dos aspectos fundamentales: el primero, conocer la existencia de competencias y polimorfismos en las rutas metabólicas de los medicamentos antitrombóticos; y segundo, establecer la relación entre esta “resistencia” o “no respuesta” al fármaco y la presencia de complicaciones trombóticas arteriales, especialmente en los pacientes sometidos a intervenciones de revascularización coronaria (Altman R, 2010).

Debido a que el término de “resistencia” refiere mucha confusión, muchos autores han establecido el término de “no respuesta” al Clopidogrel. De esta manera nos referiremos en este estudio al grupo de pacientes que no responden adecuadamente al clopidogrel como “no respondedores”.

La variabilidad al clopidogrel es amplia, y algunos autores reportan al grupo de los “no respondedores” entre el 5 al 44% (De Miguel Antonio, 2008), del 5 y 40% (Angiolillo D,

2010), y del 4 al 46% (Ait-Mohktar O, 2012). De tal manera que existe un porcentaje relativamente alto de pacientes que muestran efectos subóptimos del medicamento, y la trascendencia de esto es el hecho de que multitud de estudios han observado una asociación entre la baja respuesta y eventos cardiovasculares adversos (Angiolillo DJ, 2007) (Ferreiro JL, 2009).

En la Figura 3 se muestran los múltiples mecanismos que se han identificado múltiples que influyen en la variabilidad de la respuesta al Clopidogrel. Pueden resumirse en tres grandes categorías: factores genéticos, celulares y clínicos. (Angiolillo D, Ferreiro. J., 2010)

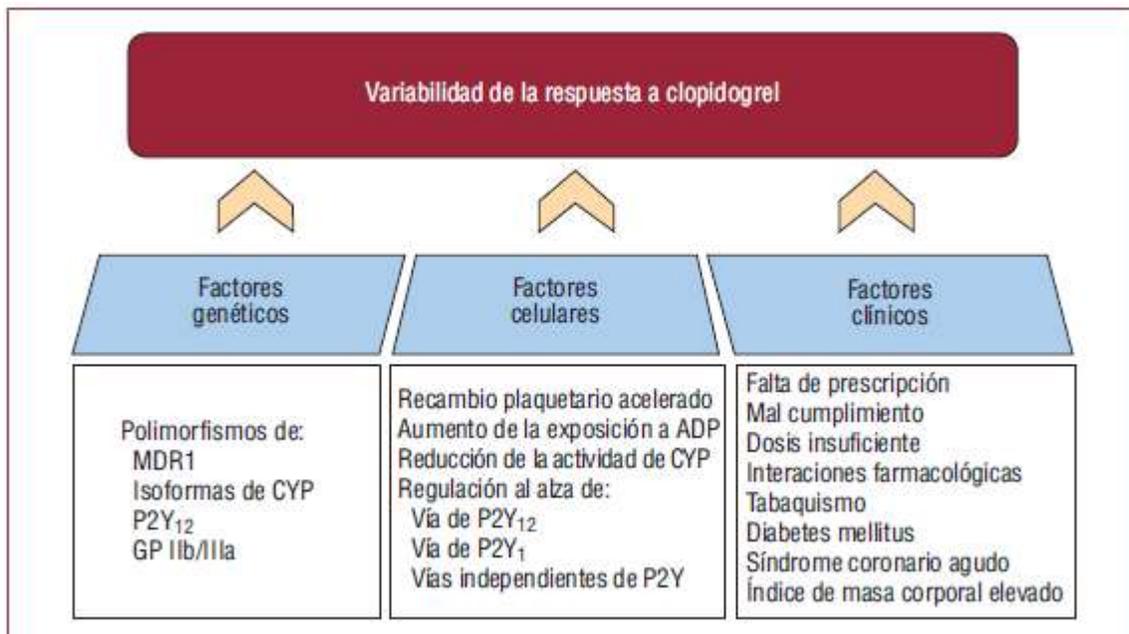


Figura 3. Mecanismos involucrados en la variabilidad de la respuesta a clopidogrel.

ADP: adenosindifosfato; CYP: citocromo P450; GP: glucoproteína; MDR: transportador de resistencia a múltiples fármacos. Angiolillo DJ et al. Inhibición del receptor de P2Y₁₂

2.9 Factores genéticos

2.9.1 Polimorfismos del citocromo P450

El sistema de enzimas del citocromo P450 juegan un importante papel en el metabolismo de muchos medicamentos y otros xenobióticos. El citocromo P450 humano consiste en aproximadamente 30 isoenzimas relacionadas, entre ellas destaca la isoenzima codificada en el gen CYP2C19, la cual puede presentar polimorfismos genéticos y se asocia a una variabilidad en la respuesta a fármacos. (Zand N, 2005)

La mayoría de los factores genéticos responsables de la variabilidad a la respuesta del tratamiento farmacológico son polimorfismos de nucleótido sencillo, más comúnmente conocidos por las siglas en inglés SNP. Este tipo de polimorfismos son muy frecuentes en el genoma humano. (Rodríguez-Arcasa MJ, 2011)

La subfamilia CYP2C consiste en al menos 4 isoformas: 2C8, 2C9, 2C18 y 2C19, cuyos genes están localizados en el cromosoma 10. Algunos desórdenes genéticos, particularmente polimorfismos en genes que codifican isoenzimas de la familia del citocromo P450, se han visto que pueden tener influencias significativas en la respuesta a clopidogrel. Estudios recientes se han enfocado específicamente en el estudio de polimorfismos de la isoenzima CYP2C19. (Yukhanyan L, 2011).

La isoenzima CYP2C19 se relaciona en los dos pasos que requiere el Clopidogrel para su conversión en el metabolito activo, un tiol que une irreversiblemente al receptor plaquetario P2Y₁₂ del ADP (Umemura K, 2008). El defecto genético del CYP2C19*2 es una mutación de nucleótido sencillo (SNP) en el exon 5 que crea un sitio aberrante de edición del

mensajero. El SNP presentado es un cambio de una Adenina en lugar de una Guanina (nucleótido original) en la posición 681 a partir del codón de inicio de la secuencia codificante del gen (rs4244285). (Genecards) El alelo “con pérdida de la función” CYP2C19*2, es el polimorfismo más estudiado (Pettersen A, 2011) (Hochholzer W, 2010) y se ha asociado con la reducción en el metabolismo del Clopidogrel y con un aumento de ECCVM en pacientes bajo tratamiento con el antiplaquetario (DietmarTrenk D, 2008) (Shuldiner A, 2009). Por tanto se ha asociado con un peor diagnóstico de los pacientes después de la ICP (Bonello L A. S.-M.-B.-G.-J., 2010). CYP2C19*2 se puede presentar como homocigoto (AA) o heterocigoto (GA). Los pacientes que no presentan este polimorfismo, presentan un genotipo del tipo GG.

De acuerdo a la variante alélica en el gen que codifica para la enzima CYP2C19, se han establecido tres tipos distintos de fenotipos de metabolización: metabolizadores normales (CYP2C19*1), metabolizadores lentos (CYP2C19*2 y CYP2C19*3) y metabolizadores ultrarrápidos (CYP2C19*17) (Rodríguez-Arcasa MJ, 2011).

La frecuencia de pobres metabolizadores CYP2C19*2 varía de acuerdo con la población de estudio. En Asiáticos se presenta en un 18-23%, 2-5% en Caucásicos y en Africanos 4%. (Zand N, 2005) En población mexicana se desconoce su prevalencia.

Tomando en cuenta lo anterior, resultaría importante identificar a aquellos portadores de la variante alélica responsable de la metabolización lenta del Clopidogrel, ya que en ellos podría resultar una disminución en el efecto antiplaquetario y por lo tanto representaría en ellos un mayor riesgo de presentar efectos cardio cerebrovasculares adversos.

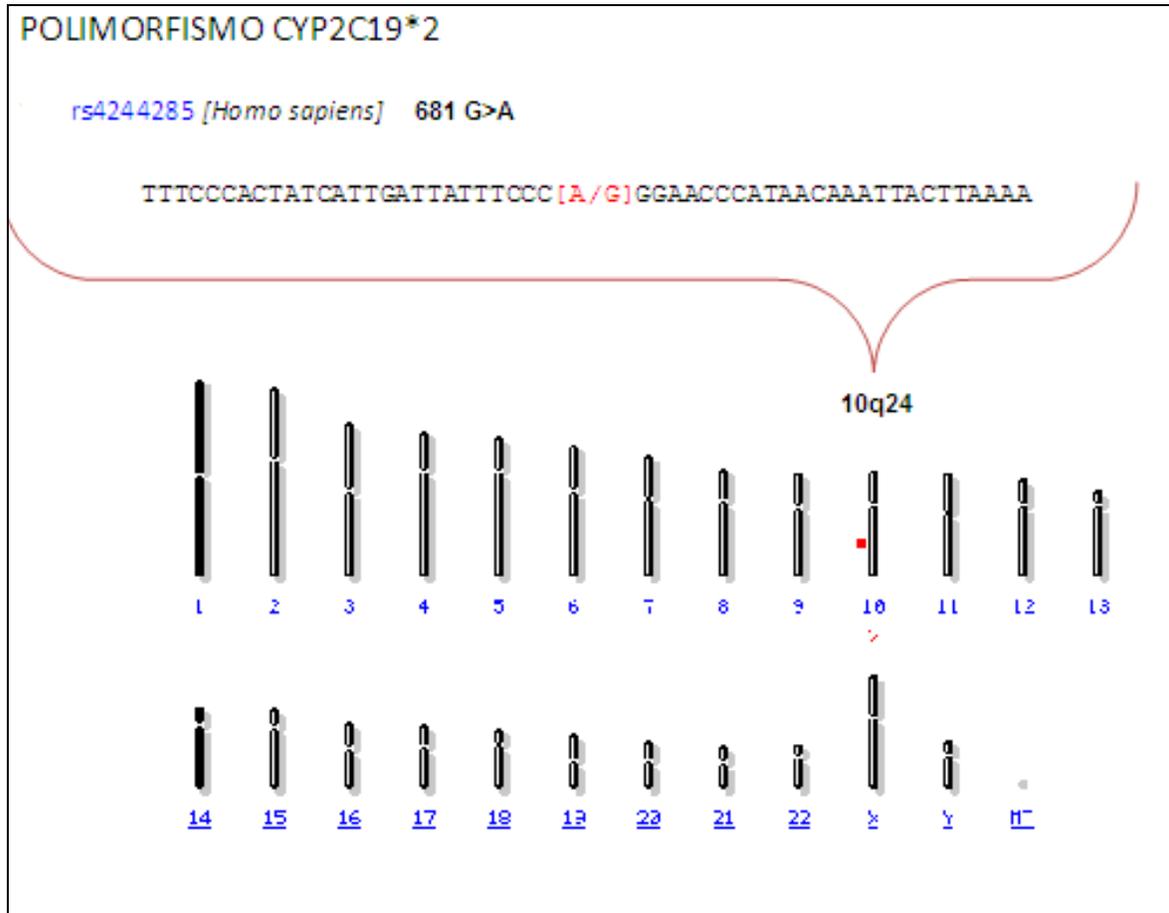


Figura 4. Características del CYP2C19*2
(Genecards)

2.10 Implicaciones clínicas a la variabilidad en la respuesta al Clopidogrel

Las implicaciones clínicas de la resistencia al clopidogrel se han descrito en varios estudios clínicos. Se ha demostrado que los pacientes con peor respuesta al Clopidogrel presentaron un mayor riesgo de padecer ECCVM comparados con pacientes que respondieron adecuadamente sometidos a ICP (Geisler T, 2006). El grupo de estudio de Matetzky (2004) (Matetzky S, 2004) demostraron que una menor inhibición de la agregación plaquetaria se relacionaba con la recurrencia de eventos adversos a los 6 meses. La recurrencia de ECCVM está relacionada con la reactividad plaquetaria post tratamiento en diversos estudios clínicos (De Miguel Antonio, 2008).

De esta manera es de suma importancia identificar a los pacientes que presentan una alta reactividad plaquetaria en tratamiento (*ARPET*) para evitar complicaciones trombóticas en ellos.

Bonello y colaboradores (Bonello L C.-J. L., 2008) presentaron en su estudio del 2008 una estrategia de tratamiento basada en los resultados de IRP obtenidos mediante el análisis de la fosforilación de VASP/P2Y12 por citometría de flujo. La estrategia consistió en ajustar la dosis de Clopidogrel hasta obtener un IRP < 50%, encontrándose diferencias significativas con el grupo control.

2.11 Monitoreo de la actividad plaquetaria

En los últimos años, después de conocer la variabilidad que existe a la respuesta a Clopidogrel, ha crecido el interés por pruebas de función plaquetaria que guíen la terapia

antiplaquetaria (Hochholzer W, 2010) y que puedan identificar precozmente a pacientes con alto riesgo trombótico debido a una hiperreactividad plaquetaria sostenida. (Rivera J, 2007)

La batería de pruebas de función plaquetaria es actualmente amplia y diversa. En la Figura 5 se muestran las principales pruebas.

| Pruebas de función plaquetaria | | | |
|--|---|---|--|
| <i>Prueba</i> | <i>Aspecto valorado</i> | <i>Ventajas</i> | <i>Desventajas</i> |
| Agregación en plasma rico en plaquetas (PRP) | Agregación entre plaquetas valorada por cambio de transmisión de luz del PRP tras activación con agonistas y a bajo flujo | Muy versátil (agonistas/dosis) Es el método de referencia Diagnóstico | Laborioso, caro, personal cualificado Exige alto volumen de sangre y manipulación previa Respuesta plaquetaria en condiciones no fisiológicas No válido si hay trombopenia intensa Limpieza de electrocitos (no en los nuevos equipos) |
| Agregación en sangre total (ST) | Agregación entre plaquetas valorada por cambio de impedancia en ST tras adición de agonistas | Versátil Menos volumen de ST y sin manipulación | Menos sensible que agregación estándar en PRP No detecta la segunda onda |
| Citometría de flujo | Unión de ligandos marcados con fluorocromos a plaquetas, usando un citómetro de flujo; cuantificación de agregados entre plaquetas o entre plaquetas y leucocitos | Poco volumen de muestra (ST, PRP, o plaquetas lavadas); muy versátil (identificación de receptores; marcadores de activación, agregados celulares, micropartículas, etc.); uso cada vez más extendido | Personal cualificado; reactivos caros; los citómetros son equipos caros y delicados |
| PFA-100® | Tiempo de formación de un trombo oclusivo sobre membrana trombogénica en condiciones de alto flujo | Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos Amplia experiencia de uso | Inflexible; caro; muy dependiente de hematocrito, FFW y recuento plaquetas; no específico, insensible a deficiencias moderadas |
| VerifyNow® | Agregación de plaquetas sobre bolas cargadas con fibrinógeno, en respuesta a agonistas | Simple y rápido; poco volumen de ST; posible en laboratorios clínicos Licencia FDA para monitorización de antiagregantes | Inflexible; caro; no específico; limitada experiencia |

Figura 5. Principales pruebas de función plaquetaria

(Rivera J, 2007)

Existen varios métodos que evalúan la función plaquetaria, sin embargo hay controversia en cuanto al método más apropiado: no existen guías recomendadas al respecto ni se ha determinado el valor de corte óptimo que establezca la relación más adecuada entre la

actividad de las plaquetas en pacientes bajo tratamiento con Clopidogrel con los ECCVM. Es por eso que la medición de la reactividad plaquetaria por diferentes métodos como rutina en la práctica médica no ha sido ampliamente implementada. (Bonello L T. U.-W., 2010) Pese a esto, muchos estudios han demostrado una clara asociación entre una reactividad plaquetaria alta en tratamiento determinada por varios métodos y ECCVM. (Bonello L Tantry. U.-W., 2010) (Figura 5).

La agregometría óptica ha sido el método usado en muchos estudios para valorar el efecto del tratamiento con clopidogrel y se ha considerado el estándar de oro, lo cual se debe más a la cuantiosa información disponible con esta técnica que a sus ventajas sobre otras. Varias circunstancias, como el tiempo, el equipo y el entrenamiento para llevar a cabo esta técnica, la preparación del plasma rico en plaquetas que es susceptible a una activación plaquetaria debida a manipulación de la muestra, provocan que su uso no sea factible en un laboratorio de cardiología intervencionista. (De Miguel Antonio, 2008) Aunado a esto, diversos estudios clínicos que utilizaron agregometría óptica para evaluar la eficacia de la terapia antiplaquetaria mostraron una variabilidad interlaboratorio de hasta el 30% (Cayla G, 2008).

La agregometría óptica presenta además un inconveniente de especificidad ya que en la agregación inducida con ADP (agonista empleado en este método) no solo interviene el receptor plaquetario P2Y₁₂, diana del clopidogrel, sino también otros receptores del nucleótido (P2Y₁ y P2X₁). Esto podría explicar en parte la heterogeneidad en la respuesta de agregación con ADP en los pacientes tratados con Clopidogrel (Rivera J, 2007).

Son muchas las ventajas que presenta la citometría de flujo respecto a la agregometría óptica entre ellas su simplicidad, velocidad y versatilidad. En la citometría de flujo se utiliza

muy poco volumen de muestra, solamente se necesita 30 μ L de sangre total y los resultados se obtienen en 30 minutos, se puede identificar varias poblaciones celulares (receptores, marcadores de activación, agregados celulares, micropartículas, etc) con la adición de anticuerpos específicos marcados con fluorocromos distintos (Rivera J, 2007) De esta manera se ha extendido el uso de la citometría de flujo en el estudio de la función plaquetaria.

2.12 Análisis de la fosforilación de VASP por citometría de flujo

La citometría de flujo es una metodología de uso creciente en la monitorización de Clopidogrel. Recientemente, se ha desarrollado un nuevo protocolo que consiste en la medida por citometría en sangre total de la fosforilación intraplaquetaria de la proteína estimulada por vasodilatadores VASP (VASP-P) en respuesta a la estimulación con PGE1.

VASP es una proteína de unión de actina y es un componente importante de la señal vía cAMP/cAMP de la proteína cinasa. Se expresa en casi todas las células humanas y animales, como: células neuronales, células T, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, siendo en las plaquetas donde se encuentra en mayor cantidad. (Wentworth J, 2006) La fosforilación de VASP en el sistema vascular está correlacionada con la inhibición de la adhesión/agregación de las plaquetas.

En presencia de ADP, potente agonista plaquetario, la activación del receptor P2Y12 vía Gi inhibe la síntesis de AMPc y con ello la fosforilación de VASP. Sin embargo, en los pacientes con clopidogrel P2Y12 está bloqueado y el ADP es incapaz de reducir la fosforilación de VASP por PGE1. De esta manera la fosforilación de VASP es un proceso

dependiente del nivel de activación del receptor plaquetario P2Y12 y por tanto evalúa la eficacia de la terapia con Clopidogrel. (Rivera J, 2007) (Aleil B, 2005)

La fosforilación de VASP se puede medir fácilmente por citometría de flujo. Este método utiliza el Índice de Reactividad Plaquetaria expresado como porcentaje, para expresar la diferencia en la intensidad de fluorescencia del VASP entre las plaquetas inhibidas y activadas. (Aleil B, 2005).

Mediante la técnica de fosforilación de VASP/P2Y12 por citometría de flujo se obtiene el IRP, el cual expresa el porcentaje de plaquetas activas. No existe aún un punto de corte de IRP estandarizado, sin embargo sí está aceptado que a mayores porcentajes de IRP menor efectividad del fármaco.

En este estudio se utilizó el punto de corte de Barragán y colaboradores (Barragán P, 2003) donde un $IRP_{VASP} \geq 50\%$ definió a los “no respondedores al Clopidogrel”. Diversos estudios mostrados en la tabla 1, han identificado a este punto de corte, como apropiado para identificar pacientes con riesgo de trombosis del stent o la presencia de eventos adversos cardiocerebrovasculares mayores (ECCVM). (Morris A, 2009)

Tabla 1. Grupos de trabajo que han estudiado la fosforilación de VASP por citometría de flujo y puntos de corte sugeridos que relacionan con ECCVM

| Estudio | Pacientes (n) | Tratamiento | Método | Definición | Relevancia clínica |
|--|---|---|--|----------------|--|
| Barragán et al (Barragán P, 2003) | ICP (46) | 250 mg/d Ticlopidina o 75 mg/d Clopidogrel | VASP-IRP | > 50% VASP-IRP | ↑ Trombosis del stent |
| Blindt et al (Blindt R, 2007) | Alto riesgo de trombosis del stent / ICP (99) | 75 mg/d Clopidogrel por 6 meses | VASP-IRP (72 -96 horas después del stent) | > 48% VASP-IRP | ↑ Trombosis del stent |
| Bonello et al (Bonello L, 2007) | ICP/stent (144) | 300 mg dosis de carga | VASP-IRP | > 50% VASP-IRP | ↑ ECCVM a los 6 meses post ICP |
| Bonello et al (Bonello L C.J. L., 2008) | ICP/stent (162) | 600 mg dosis repetidas hasta IRP < 50% | VASP-IRP | > 50% VASP-IRP | ↓ eventos isquémicos al mes |
| Bonello et al (Bonello L, 2009) | ICP/stent (214) | 600 mg dosis repetidas hasta IRP < 50% | VASP-IRP | > 50% VASP-IRP | ↓ Trombosis del stent temprano y ECCVM |

(Bonello L T. U.-W., 2010)

2 JUSTIFICACION

En población mexicana se desconoce el porcentaje de pacientes que presentan baja respuesta a Clopidogrel y que estarían en riesgo de presentar ECCVM a pesar de estar bajo tratamiento antiplaquetario. Por lo que resulta importante identificar a este grupo de pacientes por medio de la evaluación de la fosforilación del VASP, marcador específico para la reactividad del receptor P2Y12 y por tanto la inhibición inducida por clopidogrel, mediante la citometría de flujo.

Se desconoce también el porcentaje de pacientes que presentan la variante alélica CYP2C19*2 que se relaciona con una disminución en la transformación del Clopidogrel a su metabolito activo y por tanto con la no respuesta a este antiplaquetario.

3 HIPOTESIS

Existe variación interindividual a Clopidogrel en población mexicana y ésta se relaciona con la presencia de polimorfismos en el citocromo P450.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la prevalencia de baja respuesta a Clopidogrel y su relación con el polimorfismo del CYP2C19*2 en una cohorte de pacientes sometidos a Intervención Coronaria Percutánea.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el IRP mediante el análisis de la fosforilación de VASP por citometría de flujo.
2. Determinar si existe baja respuesta al Clopidogrel, correlacionar parámetros clínicos y resultados obtenidos con el desarrollo de ECCVM a un plazo de 6 meses y evaluar si el IRP posee valor predictivo para ellos.
3. Determinar la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 y relacionarlo con la baja respuesta al tratamiento con Clopidogrel.

Objetivos específicos y estrategia a seguir para lograrlos

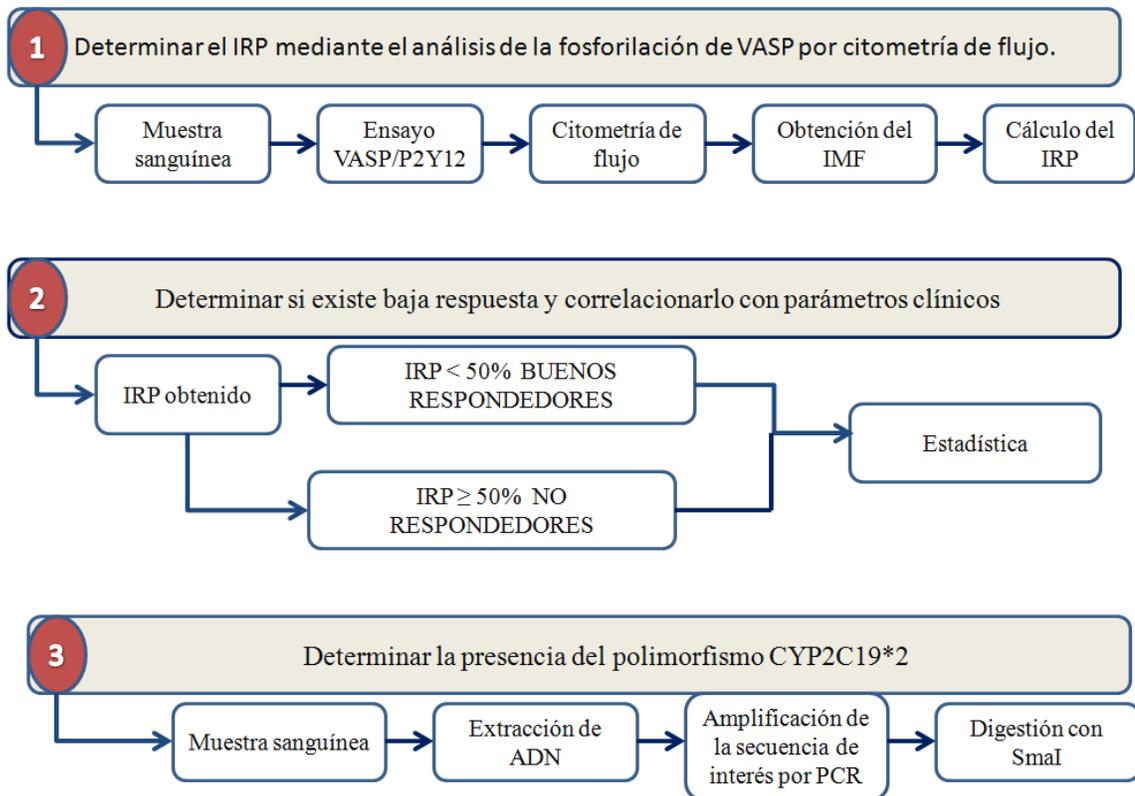


Figura 6. Objetivos específicos y estrategia a seguir para lograrlos.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 *Sitio de estudio:*

Unidad de Hemodinamia del Hospital General “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia, Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular y Laboratorio de Genética de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH.

5.2 *Muestra:*

Pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) sometidos a intervención coronaria percutánea (ICP) bajo tratamiento dual con Clopidogrel y Aspirina y que hayan cumplido los criterios de inclusión en el periodo comprendido de Marzo de 2009 a Febrero de 2012.

El estudio fue realizado en concordancia con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado (formato anexo). El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital General “Dr. Miguel Silva” (Número de oficio: 5009/083/09) (Se anexa copia de aprobación de protocolo)

5.3 *Tipo de estudio:*

Experimental de cohorte prospectivo longitudinal.

5.4 Criterios:

5.4.1 Criterios de inclusión:

Pacientes con diagnóstico de: Infarto Agudo Miocárdico sin elevación del Segmento ST (IAMSEST), angina inestable o isquemia silenciosa, sometidos a ICP y que hayan recibido dosis de carga de 600mg de Clopidogrel 6-8 horas previas a la intervención.

5.4.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes con infarto agudo miocárdico con elevación del segmento ST (IAMEST)
- Pacientes sometidos a tratamiento con inhibidores de la bomba de protones.
- Pacientes con alteraciones hepáticas.
- Pacientes con contraindicación para el uso de antiplaquetarios.
- Pacientes con historia de diátesis hemorrágica.

5.4.3 Criterios de eliminación

- Pacientes que decidan retirarse del estudio.
- Pacientes cuyas muestras biológicas no hayan sido procesadas/almacenadas en las condiciones idóneas y por lo tanto no aseguren su calidad biológica.
- Pacientes cuyas muestras sanguíneas resultaron lipémicas o hemolizadas.

Los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión fueron invitados a participar en el estudio, explicándoles en qué consistía el mismo, y se les presentó la carta de

consentimiento bajo información. En la misma entrevista, se recabaron los datos clínicos del paciente.

5.5 Obtención de muestras:

Se extrajo sangre arterial por punción femoral o radial de 6 a 8 horas posteriores a la administración de la dosis de carga de Clopidogrel (600 mg) (Toma 1). Se desecharon los primeros 5 mL para evitar la activación plaquetaria. La sangre fue recolectada en tubos vacutainer con 0.109 mol/L de citrato sódico como anticoagulante (BD Vacutainer, Becton Dickinson) para el análisis de fosforilación de VASP y en tubos vacutainer con 7.2 mg de EDTA (BD Vacutainer, Becton Dickinson) para la extracción de ADN. Las muestras fueron enviadas al laboratorio para su análisis.

A las 24 horas posteriores a la dosis de carga (Toma 2), se obtuvo una segunda muestra sanguínea por punción venosa en el antebrazo, desechando de igual manera los primeros 5 mL. La sangre fue recolectada en tubos vacutainer con 0.109 m/L de citrato sódico (BD Vacutainer, Becton Dickinson) para el análisis de fosforilación de VASP.

5.6 Análisis de la fosforilación de VASP por citometría de flujo:

El análisis del índice de fosforilación del VASP se realizó durante las 5 horas posteriores a la recolección de la muestra mediante el uso del kit comercial PLT VASP/P2Y12 (Biocytex, France) – IVD de la siguiente manera:

Sobre una gradilla y por cada muestra, se colocaron 3 tubos de plástico marcados como T1, T2 y T3 y se realizaron los siguientes pasos:

a) Preparación de la muestra:

En el tubo T1 se dispensaron 10 μ L de PGE1. En los tubos T2 y T3 se dispensaron 10 μ L de PGE1 + ADP. Se añadieron a todos los tubos (T1, T2 y T3) 10 μ L de sangre total. Se homogeneizaron durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex ajustado a velocidad lenta y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

b) Fijación

Se añadieron 10 μ L de paraformaldehído como fijador en los tubos T1, T2 y T3. Se homogeneizaron durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.

c) Permeabilización celular e inmunomarcaje

Se añadieron 10 μ L de anticuerpo monoclonal de ratón anti VASP-P + permeabilizante en los tubos T1 y T2. En el tubo T3 se añadieron 10 μ L de anticuerpo monoclonal de ratón +

permeabilizante. Se homogeneizaron durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.

d) Marcaje fluorescente y detección plaquetaria

Se añadieron 10 μ L de anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con FITC) + reactivo de detección plaquetaria marcado con PE (anti CD61-PE) en los tubos T1, T2 y T3. Se homogeneizaron durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de disolvente en los 3 tubos.

Las muestras así preparadas se conservaron a 2-8 °C hasta 2 horas antes de ser adquiridas en el citómetro de flujo marca BECTON COULTER EPICS ALTRA.

El parámetro estadístico indicativo de la intensidad media de fluorescencia (IMF) que se utilizó fue la media geométrica (Media de “y”).

Antes de la adquisición en el citómetro de flujo, se homogeneizaron los tubos durante 1 ó 2 segundos con un agitador tipo Vórtex. Se analizó una población de 20 000 plaquetas incluidas en la ventana "B". Para el análisis de las muestras, se requirieron un diagrama de nubes de puntos FS LOG x SS LOG y un diagrama FL1 LOG x FL2 LOG de la siguiente manera:

A. Análisis del tubo T1:

Sobre el diagrama FS LOG x SS LOG, se dibujó una región “A” seleccionando la nube celular en la que estaban incluidas las plaquetas. Se descartaron de esta región “A” la población de leucocitos. Se preparó el diagrama FL1 LOG x FL2 LOG de forma que sólo

mostró los eventos contenidos en la región “A” (Gate: A). Se ajustaron los voltajes del fotomultiplicador FL2 (PMT FL2) hasta situar la población celular FL2+ en la 3ª década y del fotomultiplicador FL1 (PMT FL1) hasta situar la población celular FL1+ / FL2+ en la 2ª década. Sobre el diagrama FL1 LOG x FL2 LOG, se dibujó una región “B” que incluyó la población de plaquetas FL2+ y excluyó los restos celulares FL2. Se obtuvo el valor de la IMF en FL1 (Media de “y”) correspondiente a esta región.

B. Análisis de los tubos T2 y T3:

Sin modificar la posición de la región "B" y los ajustes PMT SS, FS, FL1 y FL2 del fotomultiplicador previamente optimizados, se analizaron los tubos T2 y T3. Se obtuvo el valor de la IMF en FL1 (Media de “y”) correspondiente a la región B de los tubos T2 y T3.

Tras la adquisición de los tubos en el citómetro, se calcula el valor de las IMF corregidas (IMFc) de los tubos T1 y T2. La IMFc se obtiene restando el valor de IMF obtenido en el control negativo (tubo T3) a los valores IMF obtenidos con AcM anti VASP-P (los tubos T1 ó T2).

$$\text{IMFc (PGE1)} = \text{IMFc (T1)} = \text{IMF (T1)} - \text{IMF (T3)}$$

$$\text{IMFc (PGE1 + ADP)} = \text{IMFc (T2)} = \text{IMF (T2)} - \text{IMF (T3)}$$

El índice de reactividad plaquetaria (IRP) se calcula a partir del índice de intensidad media de fluorescencia corregida (IMFc) de la muestra estudiada en presencia de PGE1 sola (PGE1) o de PGE1 + ADP (PGE1+ADP), según la fórmula siguiente:

$$\text{IRP} = [(\text{IMFc PGE1} - \text{IMFc (PGE1 + ADP)}) / \text{IMFc PGE1}] \times 100$$

Donde se definió la reactividad plaquetaria alta durante el tratamiento antiplaquetario como $\text{IRP} \geq 50\%$ (Barragán P, 2003)

El tratamiento antiplaquetario post-intervención consistió en 75 mg/día de Clopidogrel y 80-100mg/día de Aspirina durante por lo menos 1 mes post-intervención. Se dio seguimiento a los pacientes y se evaluó la incidencia de Eventos Cardio Cerebro Vasculares Mayores (ECCVM) durante los 6 meses siguientes a la intervención.

5.7 Extracción de ADN:

Para la extracción de ADN se siguió la técnica convencional de fenol – cloroformo, utilizando la muestra sanguínea arterial contenida en el tubo con EDTA, de la cual se toman aproximadamente 2 ml que se colocan en tubo con resina marca BD Vacutainer. A este tubo se le agregan 2 ml regulador de lisis (Tris-HCl 100mM, pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100mM, EDTA 50 mM) y 1.2 ml de fenol equilibrado pH 8.0, se agita vigorosamente y se centrifuga durante 10 min a 10621 g.

Tras la centrifugación los restos celulares quedaron atrapados en la resina y las biomoléculas quedaron suspendidas en la fase acuosa. De esta fase se separaron alícuotas de 400 µL en tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf de 1.5 mL, las cuales fueron tratadas

nuevamente con 200 μ L de fenol y 200 μ L de cloroformo, agitando vigorosamente y centrifugando durante 10 min a 9279 g. Posteriormente el sobrenadante (fase acuosa) se separó y se transfirió a otro tubo de microcentrífuga vacío, donde se precipitó con un volumen de isopropanol frío y se incubó 30 minutos a -20°C . Pasado este tiempo se centrifugó durante 10 min a 9279 g, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con 200 μ L de etanol. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en un volumen aproximado de 50 μ L de agua desionizada. La calidad del ADN extraído fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (BrEt) (Sambrook J et al, 2001). El gel se visualiza en un fotodocumentador Chemi Doc (Bio Rad)

5.8 Amplificación del ADN:

A partir del ADN extraído se amplifica un fragmento de 316 pb del gen CYP2C19. Para ello se llevó a cabo la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en una mezcla de reacción de 25 μ L que contenía 20 mM de Buffer Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mM de MgCl_2 , 10 μ M del iniciador sentido y 10 μ M del iniciador anti-sentido para el polimorfismo CYP2C19*2 (Tabla 1), (Hulot JS et al, 2006) 1.25 U de la TAQ ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, Brazil) y aproximadamente 300 ng de ADN de cada muestra. Las condiciones de amplificación se modificaron ligeramente de lo descrito por Zand N et al, 2006. Brevemente, se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento de 60°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min; y por último una extensión final de 72°C por 7 min. Se utilizó un termociclador GeneAmp.PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA). La presencia del

producto de amplificación esperado fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt a 75 voltios durante 80 min (Sambrook J et al, 2001). Se utilizó marcador de peso molecular Invitrogen 1 Kb plus DNA Ladder. La visualización del gel se efectuó con luz ultravioleta mediante el fotodocumentador Chemi Doc (Bio Rad) y se utilizó el programa Quantity one (Bio Rad) para observar la imagen obtenida.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para determinar el polimorfismo CYP2C19*2 y sus características

| CYP2C19*2 | |
|--|----------------------------------|
| SNP 681 G > A exón 5 (rs4244285) | |
| INICIADORES PARA DETECTAR POLIMORFISMO CYP2C19*2 | |
| Sentido | 5'- CAGAGCTTGGCATATTGTATC - 3' |
| Antisentido | 5'- GTAAACACACAAAAGTAGTCAATG -3' |
| PRODUCTO DE AMPLIFICACION | |
| <p> CAGAGCTTGGCATATTGTATCTATACCTTTATTAATGCTTTTAATTTAATAAATTATTGTTTT CTCTTAGATATGCAATAATTTTCCCACTATCATTGATTATTTCCCAGGGAAACCCATAACAAA TTAATAAAAACCTTGCTTTTATGGAAAGTGATATTTTGGAGAAAAGTAAAAGAACACCAAGA ATCGATGGACATCAACAACCCTCGGGACTTTATTGATTGCTTCCTGATCAAAAATGGAGAAGG TAAAATGTTAACAAAAGCTTAGTTATGTGACTGCTGCGTATTTGTGATTATTGACTAGTTT TGTG </p> <p style="text-align: center;">Tamaño 316 pb</p> | |
| SITIO DE RECONOCIMIENTO DE SmaI | |
| 5'-CCC↓GGG-3' 3'-GGG↑CCC-5' | |
| FRAGMENTOS GENERADOS POR SmaI | |
| <p> CAGAGCTTGGCATATTGTATCTATACCTTTATTAATGCTTTTAATTTAATAAATTATTGTTTT CTCTTAGATATGCAATAATTTTCCCACTATCATTGATTATTTCCC </p> <p style="text-align: center;">Tamaño 109 pb</p> <p> GGGAAACCCATAACAAATTACTTAAAAACCTTGCTTTTATGGAAAGTGATATTTTGGAGAAA GTAAAAGAACACCAAGAATCGATGGACATCAACAACCCTCGGGACTTTATTGATTGCTTCCT GATCAAAAATGGAGAAGGTAAAATGTTAACAAAAGCTTAGTTATGTGACTGCTGCGTATTTG TATTATTGACTAGTTTGTG </p> <p style="text-align: center;">Tamaño 207 pb</p> | |

5.9 Digestión con enzimas de restricción:

El producto de amplificación se digiere usando una mezcla de reacción de la enzima de restricción *SmaI* (*Serratia marcescens* Sb Invitrogen, Carlsbad CA) de la siguiente manera: 15 μL de producto de amplificación, 2 μL de 10X Buffer T, 2 μL de BSA, 1 μL de *SmaI* en un volumen final de 20 μL y se incuba durante 1 h a 37°C (Hulot JS, 2006). En los casos en los que el polimorfismo CYP2C19*2 no se encontraba presente en el fragmento de PCR, *SmaI* fue capaz de reconocer el sitio de restricción (5'-CCC↓GGG-3', 3'-GGG↑CCC-5') y generó 2 fragmentos de 109 pb y de 207 pb. Si la enzima no realizó el corte, es decir, si el fragmento contenía el polimorfismo CYP2C19*2, el producto de amplificación de 316 pb quedó intacto.

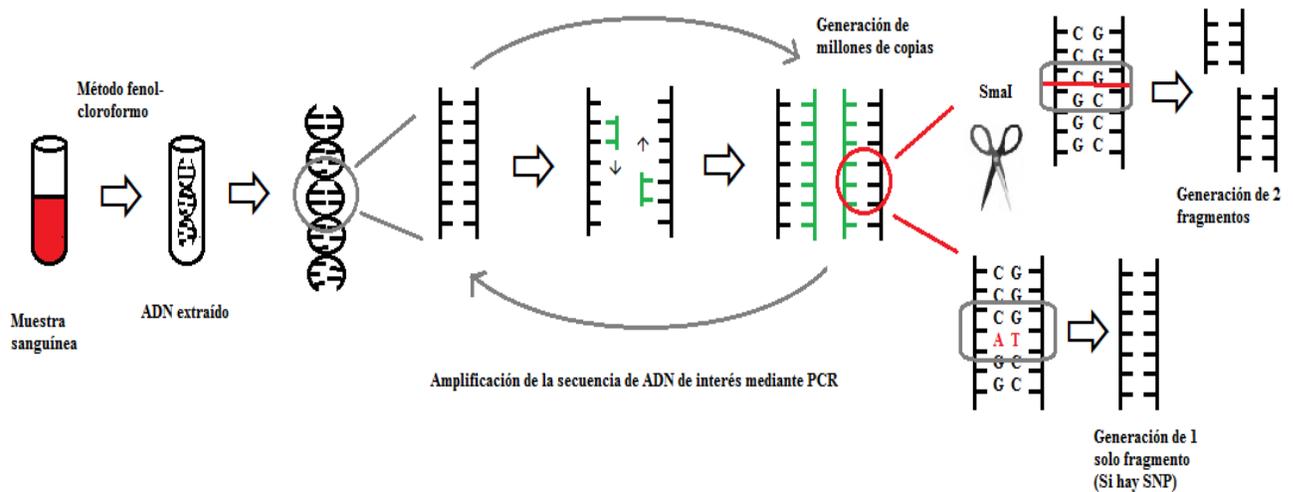


Figura 7. Esquema de la extracción del ADN, amplificación de la secuencia de interés y digestión con enzimas de restricción

Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt (Sambrook J, 2001). La visualización del gel se efectuó en un fotodocumentador Chemi Doc (Bio Rad).

5.10 *Análisis estadístico*

Se aplicó estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar ó error estándar) para variables continuas y porcentajes (%) para variables categóricas. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de los datos de las variables continuas. Las variables discretas se asociaron utilizando la prueba de X^2 (chi cuadrada). Las variables continuas con distribución normal se contrastaron con la prueba de la t de Student para datos no apareados asumiendo igualdad en varianzas y el valor de p de dos colas. Se aceptaron como estadísticamente significativos todos los valores de $p < 0.05$ y se consideró un índice de confianza de 95%. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos)

6 RESULTADOS

6.1 Datos demográficos

En el estudio participaron un total de 90 pacientes con enfermedad arterial coronaria, de los cuales 60 individuos (66.7%) presentaron síndrome coronario agudo (angina inestable, angor post IAM, IAMSEST), 24 (26.7%) fueron diagnosticados con angor estable y 6 (6.7%) presentaron isquemia silente. Del total de pacientes, 71 (78.9%) pertenecían al género masculino y 19 (21.1%) al género femenino. La edad promedio de los hombres fue de 62.7 años con una desviación estándar de ± 10.12 , con una mínima de 38 años y una máxima de 84 años. La edad promedio de las mujeres fue de 65.4 años con una desviación estándar de ± 8.3 , mínima de 45 años y máxima de 79 años. En la tabla 2 se muestran las diversas características clínicas de los pacientes.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes.

| | n= 90 |
|--|--------------|
| Hombres, n (%) | 71 (78.9) |
| Mujeres, n (%) | 19 (21.1) |
| Edad (años) (X ± DE) | 63.2 ± 9.8 |
| IMC (kg/m²) (X ± DE) | 26.6 ± 3.8 |
| Fumadores, n (%) | 52 (61.1) |
| Dislipidemia, n (%) | 55 (61.1) |
| Hipertensión, n (%) | 66 (73.3) |
| Diabetes mellitus, n (%) | 49 (54.4) |
| Historia familiar de EAC, n (%) | 42 (46.7) |
| Número de plaquetas (X ± DE) | 223.8 ± 57.6 |
| Angioplastía (colocación de stent), n (%) | 61 (67.8) |

6.2 Determinación del Índice de Reactividad Plaquetaria (IRP)

Se determinó el IRP post carga (IRP Toma 1= a las 6 u 8 horas posteriores a la dosis de carga de 600 mg de Clopidogrel) de 90 pacientes y el IRP a las 24 horas (IRP Toma 2) post carga de los 82 pacientes (se perdieron 8 muestras: 7 debido a la alta temprana de los pacientes y 1 por desenlace fatal). Para determinar el IRP se obtuvo el *Índice medio de fluorescencia (IMC)* de los tres tubos analizados por cada una de las muestras. En la figura 8 se muestran las imágenes obtenidas y las regiones analizadas de cada uno de los tubos en el citómetro de flujo marca *BECTON COULTER EPICS ALTRA*.

La media del IRP de la Toma 1 fue de $53.45 \% \pm 22.48$ (DE) y la media del IRP de la Toma 2 fue de $57.14 \% \pm 23.08$ (DE) observándose una gran variabilidad en la reactividad plaquetaria de los pacientes bajo tratamiento con Clopidogrel. En los gráficos 1 y 2 se muestran estos resultados. Mediante el estadístico de contraste paramétrico de la t de Student, no se observó diferencia significativa entre las medias del IRP Toma 1 y del IRP Toma 2. ($p=0.183$).

Imágenes obtenidas en un equipo Beckman Coulter modelo Epics Altra

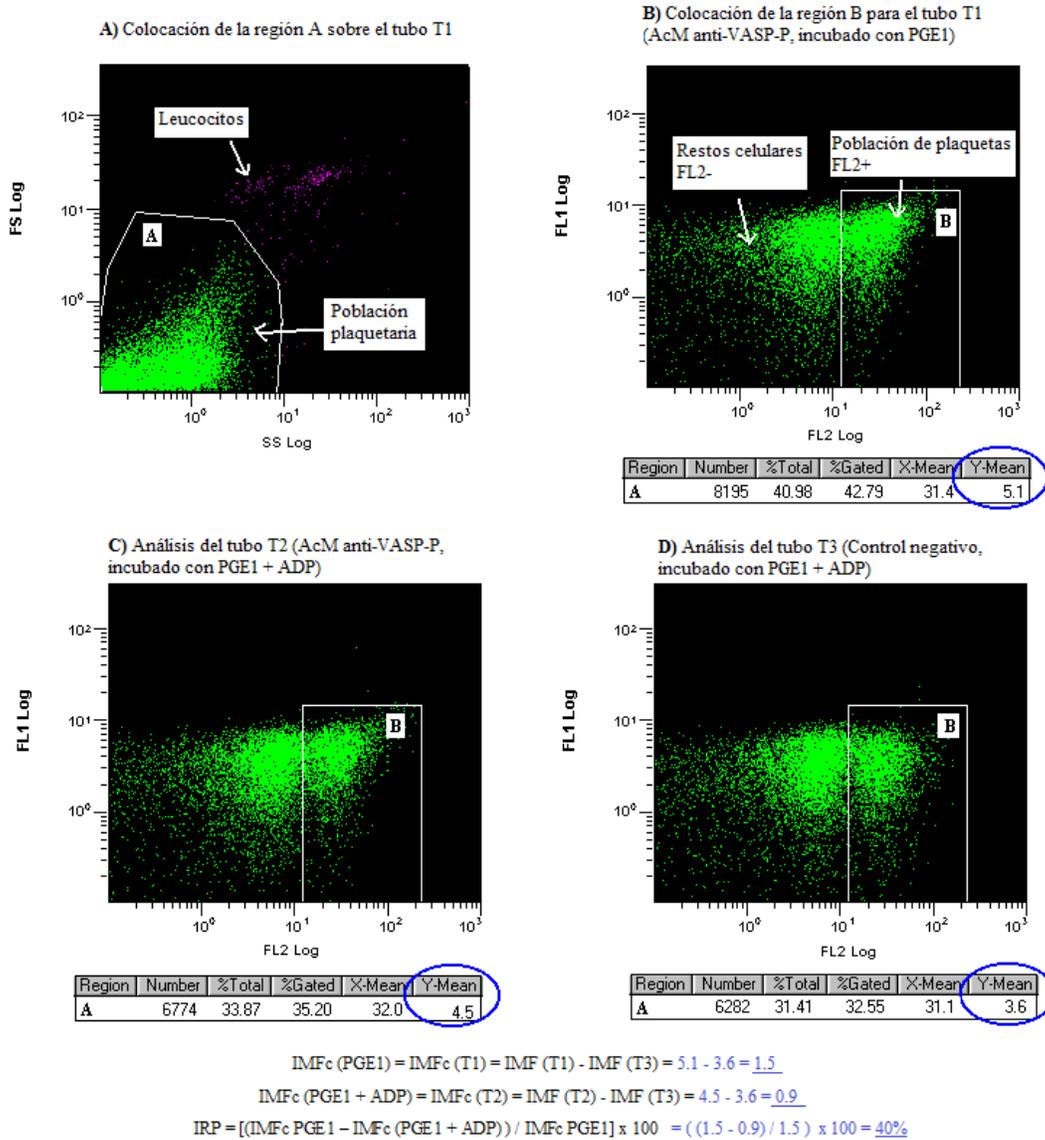


Figura 8. Imágenes obtenidas en el citómetro de flujo (BECTON COULTER EPICS ALTRA) de los tres tubos analizados para obtener el IRP.

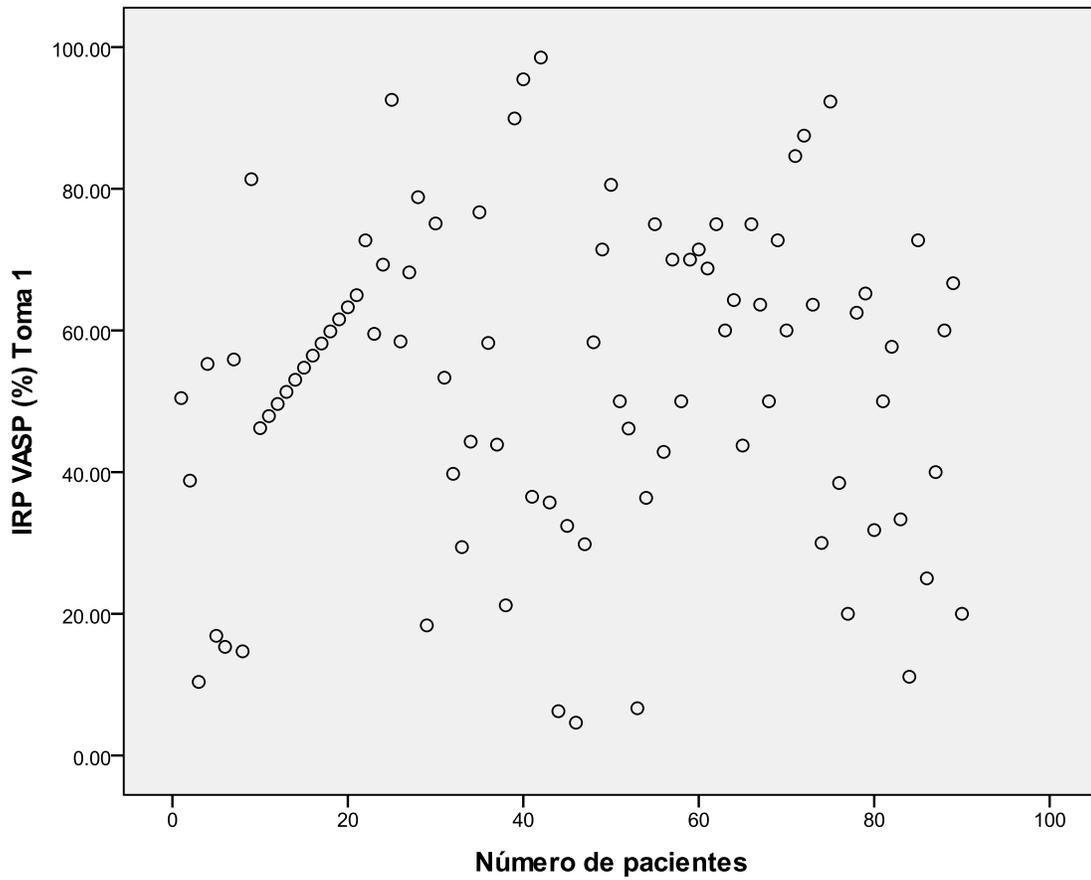


Figura 9. IRP Toma 1 de los pacientes incluidos en el estudio.

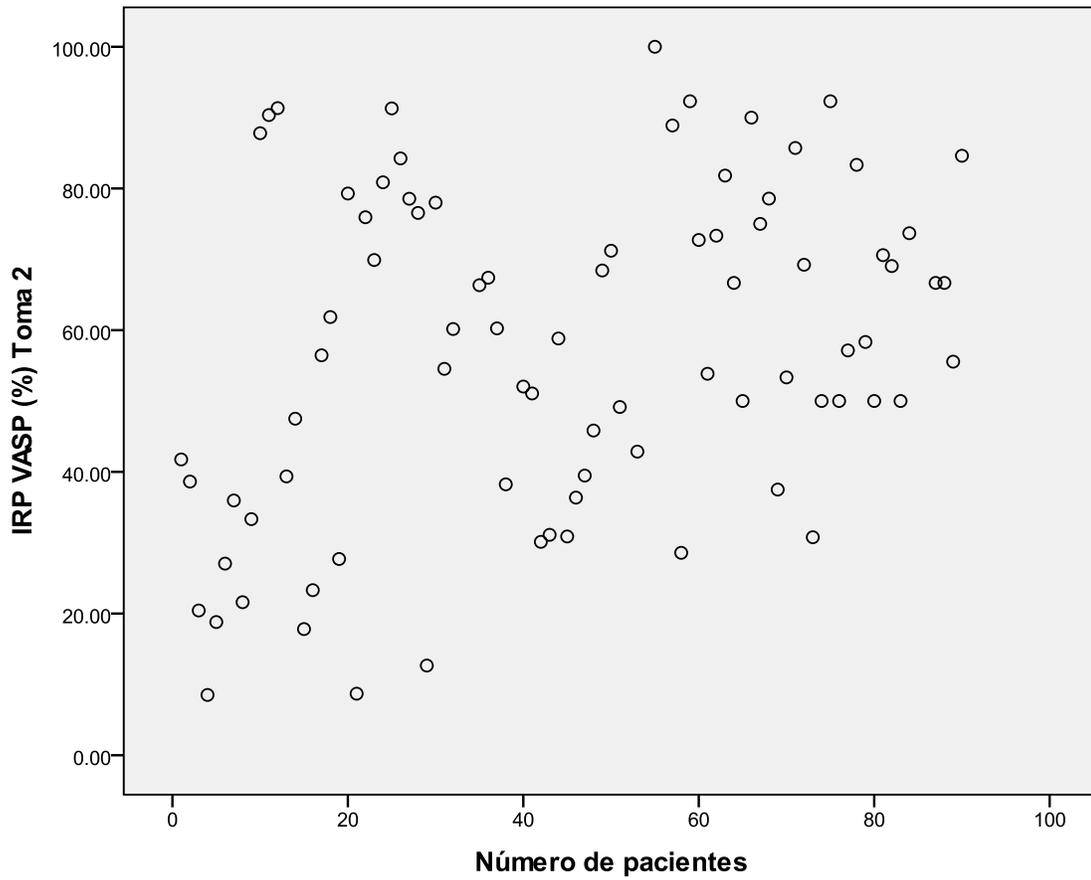


Figura 10. IRP Toma 2 de los pacientes incluidos en el estudio.

Mediante la prueba de t de Student se contrastó el valor promedio del IRP de la Toma 1 y de la Toma 2 en las diferentes variables estudiadas, encontrándose que ninguna de éstas fueron factores determinantes para la variación plaquetaria. Estos resultados se observan en la tabla 3. Sólo se observó una diferencia estadística en la variable de dislipidemia de la siguiente manera: en los pacientes que presentaron dislipidemia (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, aumento de cLDL y/o descenso de cHDL) se observó una menor reactividad plaquetaria durante la toma 2. Sin embargo aunque estadísticamente es significativo, no podemos comprobar totalmente esto ya que se necesita saber de qué manera influyó realmente la dislipidemia en la reactividad plaquetaria y desafortunadamente al realizar la historia clínica de los pacientes no se recolectaron los valores de colesterol, triglicéridos, cLDL y cHDL, solamente se definió como presencia o ausencia de dislipidemia. Así que es una observación interesante que queda para futuros trabajos. Estos resultados se pueden apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores promedio de IRP de la Toma 1 y 2 en las diversas variables del estudio.

| | % IRP Toma 1 | | | % IRP Toma 2 | | |
|---------------------------------|--------------|--------------|------------------|--------------|-------------|------------------|
| | n (%) | X ± E.E. | Sig. (bilateral) | n (%) | X ± E.E. | Sig. (bilateral) |
| Género | | | | | | |
| Hombres | 71 (78.9) | 53.16 ± 2.7 | 0.894 (t) | 63 (76.8) | 56.73 ± 2.8 | 0.767 (t) |
| Mujeres | 19 (21.1) | 52.38 ± 5.0 | | 19 (23.2) | 58.53 ± 5.6 | |
| Angioplastía | | | | | | |
| Sin angioplastía | 29 (32.2) | 51.39 ± 4.4 | 0.642 (t) | 26 (31.7) | 58.88 ± 4.7 | 0.646 (t) |
| Con angioplastía | 61 (67.8) | 53.75 ± 2.8 | | 56 (68.3) | 56.34 ± 3.1 | |
| Tabaquismo | | | | | | |
| No fumador | 36 (40.0) | 52.94 ± 3.4 | 0.966 (t) | 32 (39.0) | 56.20 ± 4.4 | 0.758 (t) |
| Fumador | 52 (57.8) | 52.73 ± 3.3 | | 48 (58.5) | 57.85 ± 3.2 | |
| Dislipidemia | | | | | | |
| Sin dislipidemia | 26 (28.9) | 56.88 ± 3.5 | 0.134 (t) | 25 (30.5) | 65.77 ± 3.9 | 0.030* (t) |
| Con dislipidemia | 55 (61.1) | 48.93 ± 3.2 | | 51 (62.2) | 53.38 ± 3.4 | |
| Diabetes mellitus | | | | | | |
| Sin DM | 41 (45.6) | 52.88 ± 3.8 | 0.964 (t) | 36 (43.9) | 57.76 ± 3.6 | 0.833 (t) |
| Con DM | 49 (54.4) | 53.09 ± 2.9 | | 46 (56.1) | 56.67 ± 3.6 | |
| Hipertensión arterial | | | | | | |
| Sin HA | 23 (25.6) | 50.24 ± 3.6 | 0.530 (t) | 21 (25.6) | 59.40 ± 4.8 | 0.583 (t) |
| Con HA | 66 (73.3) | 53.68 ± 2.9 | | 60 (73.2) | 56.17 ± 3.0 | |
| Historia familiar de EAC | | | | | | |
| No | 44 (48.8) | 52.65 ± 3.3 | 0.884 (t) | 40 (48.8) | 56.68 ± 3.9 | 0.843 (t) |
| Si | 42 (46.6) | 53.37 ± 3.7 | | 40 (48.8) | 57.72 ± 3.4 | |
| Polimorfismo CYP2C19*2 | | | | | | |
| Ausencia | 42 (82.3) | 57.30 ± 3.3 | 0.577 (t) | 38 (80.8) | 62.46 ± 3.1 | 0.801 (t) |
| Presencia | 9 (17.6) | 52.41 ± 10.6 | | 9 (19.1) | 64.35 ± 7.3 | |

t= prueba de contraste paramétrica t de student, n=número de pacientes, X=valor de la media, E.E.=error estándar, * significancia estadística p<0.05

Se observó mediante la prueba de t de student que la edad, el IMC y la cuenta de plaquetas no fueron factores determinantes para la “no respuesta” al Clopidogrel en la Toma 1. Sin embargo durante la toma 2 se observa que el promedio de edad de los pacientes que responden adecuadamente al Clopidogrel (IRP < 50%) fue mayor que los “no respondedores” (IRP ≥ 50%) (p=0.005). También se observa que la cuenta de plaquetas es mayor en los “no respondedores” en comparación con los que responden de manera adecuada durante la Toma

2 ($p=0.032$). El IMC en la Toma 2 no fue un factor importante. Estos resultados se pueden apreciar en la tabla 5.

Tabla 5. Valores promedio de edad, IMC y cuenta plaquetaria en el IRP Toma 1 y 2.

| | % IRP Toma 1 | | | % IRP Toma 2 | | |
|----------------------------|--------------|---------------|------------------|--------------|---------------|------------------|
| | n (%) | X ± E.E. | Sig. (bilateral) | n (%) | X ± DE | Sig. (bilateral) |
| Edad | | | | | | |
| IRP < 50% | 35 (38.9) | 63.17 ± 1.4 | 0.962 (t) | 30 (36.6) | 66.87 ± 1.8 | 0.005* (t) |
| IRP ≥ 50% | 55 (61.1) | 63.27 ± 1.4 | | 52 (63.4) | 60.79 ± 1.2 | |
| IMC | | | | | | |
| IRP < 50% | 35 (38.9) | 26.76 ± 0.6 | 0.804 (t) | 30 (36.6) | 27.19 ± 0.7 | 0.414 (t) |
| IRP ≥ 50% | 55 (61.1) | 26.56 ± 0.5 | | 52 (63.4) | 26.47 ± 0.5 | |
| Cuenta de plaquetas | | | | | | |
| IRP < 50% | 26 (28.9) | 232.52 ± 13.2 | 0.323 (t) | 21 (25.6) | 201.48 ± 12.6 | 0.032* (t) |
| IRP ≥ 50% | 38 (42.2) | 217.91 ± 8.1 | | 36 (43.9) | 235.85 ± 9.4 | |

t= prueba de contraste paramétrica t de student, n=número de pacientes, X=valor de la media, E.E.=error estándar, * significancia estadística $p<0.05$

El punto de corte actual para definir a los buenos respondedores de los que no lo hacen adecuadamente es un punto de controversia actualmente. Sin embargo muchos autores utilizan el punto de corte mencionado por Barragán y colaboradores (2003) (Barragán P, 2003), el cual define un IRP < 50% como buenos respondedores y un IRP ≥ 50% como “no respondedores”. De esta manera en la población estudiada se observa un 62.2% en la Toma 1 y 65.9% en la Toma 2 de “no respondedores”. En las tablas 6 y 7 se muestran estos resultados.

Tabla 6. Resultados de IRP Toma 1, considerando buenos respondedores IRP < 50% y no respondedores IRP ≥ 50%.

| Resultados IRP Toma 1 | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------|------------|
| Valor de IRP | Clasificación | n | % |
| < 50% | Buenos respondedores al Clopidogrel | 36 | 40 |
| ≥ 50% | No respondedores al Clopidogrel | 54 | 60 |
| Total | | 90 | 100 |

Tabla 7. Resultados de IRP Toma 2, considerando buenos respondedores IRP < 50% y no respondedores IRP ≥ 50%.

| Resultados IRP Toma 2 | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------|------------|
| Valor de IRP | Clasificación | n | % |
| < 50% | Buenos respondedores al Clopidogrel | 31 | 37.8 |
| ≥ 50% | No respondedores al Clopidogrel | 51 | 62.2 |
| Total | | 82 | 100 |

Al analizar la asociación de las diversas variables mostradas en la tabla 8 con el IRP mediante la prueba de chi cuadrada, no se encontró que éstas fueran factores determinantes en la respuesta al Clopidogrel. Estos resultados se aprecian en la tabla 8.

Tabla 8. Distribución de los pacientes de acuerdo al IRP (<50% y ≥50%) en las distintas variables de estudio y su significancia.

| | IRP Toma 1 | | | IRP Toma 2 | | |
|--|---------------|----------------|-------------------------|---------------|----------------|-------------------------|
| | <50% n (%) | ≥ 50% n (%) | Sig. (bilateral) | <50% n (%) | ≥ 50% n (%) | Sig. (bilateral) |
| Angioplastía | | | | | | |
| Sí | 23 (25.8) | 38 (42.2) | 0.519 (X ²) | 22 (27.5) | 34 (41.5) | 0.685 (X ²) |
| No | 13 (14.4) | 16 (17.8) | | 9 (11.3) | 17 (20.7) | |
| Antecedentes de enfermedad cardiovascular | | | | | | |
| Sí | 18 (20.0) | 24 (26.7) | 0.759 (X ²) | 15 (18.3) | 25 (30.5) | 0.937 (X ²) |
| No | 16 (17.8) | 28 (31.1) | | 15 (18.3) | 25 (30.5) | |
| Tabaquismo | | | | | | |
| Sí | 22 (24.4) | 30 (33.3) | 0.480 (X ²) | 16 (19.5) | 32 (39.0) | 0.602 (X ²) |
| No | 14 (15.6) | 22 (24.4) | | 14 (17.1) | 18 (22.0) | |
| Dislipidemia | | | | | | |
| Sí | 26 (28.9) | 29 (32.2) | 0.190 (X ²) | 24 (29.3) | 27 (32.9) | 0.071 (X ²) |
| No | 8 (8.9) | 18 (20.0) | | 5 (6.1) | 20 (24.4) | |
| Hipertensión | | | | | | |
| Sí | 25 (27.8) | 41 (45.6) | 0.502 (X ²) | 25 (30.5) | 35 (42.7) | 0.417 (X ²) |
| No | 11 (12.2) | 12 (13.3) | | 6 (7.3) | 15 (18.3) | |
| Genética | | | | | | |
| AA (Homocigoto CYP2C19*2) | 0 (0) | 2 (3.9) | 0.653 (X ²) | 0 (0) | 2 (3.9) | 0.103 (X ²) |
| GA (Heterocigoto CYP2C19*2) | 3 (5.8) | 4 (7.8) | | 3 (5.8) | 4 (7.8) | |
| GG (Normal) | 16 (31.4) | 25 (49.0) | | 10 (19.6) | 28 (54.9) | |
| Diabetes | | | | | | |
| Sí | 18 (20.0) | 31 (34.4) | 0.489 (X ²) | 20 (24.4) | 26 (31.7) | 0.231 (X ²) |
| No | 18 (20.0) | 23 (25.6) | | 11 (13.4) | 25 (30.5) | |
| Complicaciones | | | | | | |
| ECCVM | 2 (2.2) | 2 (2.2) | 0.764 (X ²) | 2 (2.4) | 1 (1.2) | 0.092 (X ²) |
| Otras complicaciones | 2 (2.2) | 1 (1.1) | | 3 (3.7) | 0 (0) | |
| Asintomático | 4 (4.4) | 7 (7.8) | | 4 (4.9) | 7 (8.5) | |
| Se desconoce evolución | 28 (31.1) | 44 (48.9) | | 22 (26.8) | 43 (52.4) | |
| Diagnóstico | | | | | | |
| SCA | 23 (25.6) | 37 (41.1) | 0.385 (X ²) | 20 (24.4) | 34 (41.5) | 0.563 (X ²) |
| Angor estable | 9 (10.0) | 15 (15.0) | | 8 (9.8) | 15 (18.3) | |
| Isquemia silente | 4 (4.4) | 2 (2.2) | | 3 (3.7) | 2 (2.4) | |
| Género | | | | | | |
| Hombres | 30 (33.3) | 41 (45.6) | 0.399 (X ²) | 24 (29.3) | 39 (47.6) | 0.921 (X ²) |
| Mujeres | 6 (6.7) | 13 (14.4) | | 7 (8.5) | 12 (14.6) | |

X²= prueba de asociación para variables discretas chi cuadrada, n=número de pacientes, X=valor de la media, E.E.=error estándar, * significancia estadística p<0.05

Al comparar el número de pacientes que obtuvieron un IRP < 50% en la Toma 1 y en la Toma 2, y un IRP ≥ 50% en las mismas tomas se obtuvo la siguiente información:

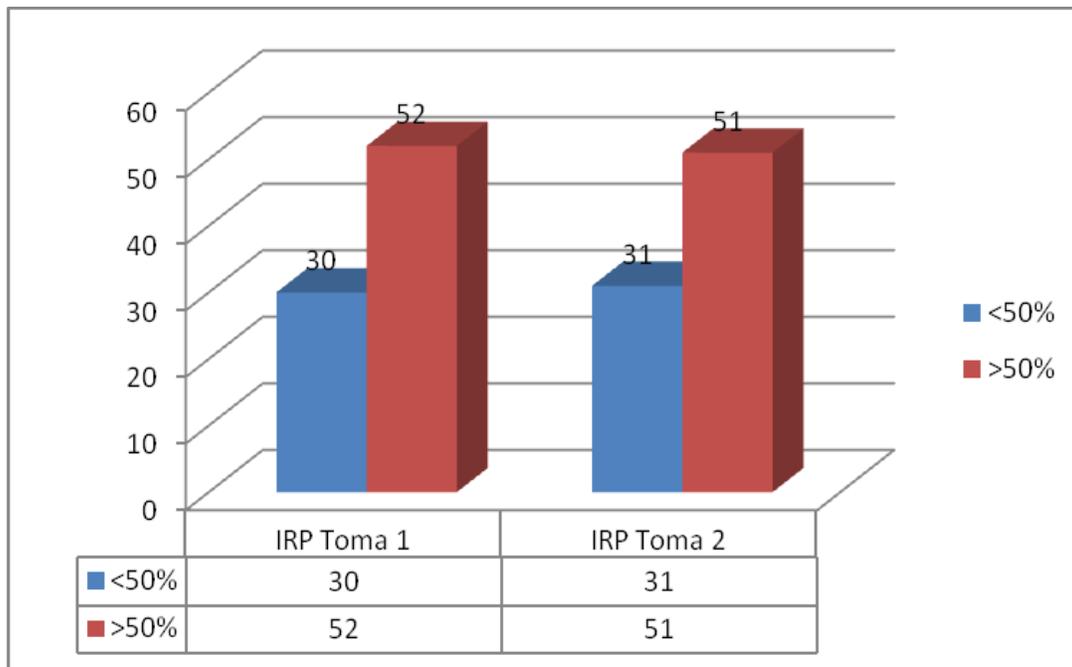


Figura 11. Distribución de los buenos respondedores y no respondedores en la Toma 1 y Toma 2

Se presenta una distribución muy homogénea en los considerados como buenos respondedores (IRP < 50%) en la Toma 1 y 2; y de igual manera en los no respondedores (IRP ≥ 50%) en las dos tomas. En la tabla 8 se muestra la tabla de contingencia para conocer la distribución de los pacientes.

Tabla 9. Distribución de los buenos respondedores y no respondedores en la Toma 1 y Toma 2

| | | IRP Toma 2 | | TOTAL |
|------------|-------|------------|------------|------------|
| | | < 50% | ≥ 50% | |
| IRP Toma 1 | < 50% | 16 (19.5%) | 14 (17.1%) | 30 (36.6%) |
| | ≥ 50% | 15 (18.3%) | 37 (45.1%) | 52 (63.4%) |
| TOTAL | | 31 (37.8%) | 51 (62.2%) | |

| Pruebas de chi-cuadrada | Sig. (bilateral) |
|------------------------------|------------------|
| Chi-cuadrada de Pearson | 0.028* |
| Razón de verosimilitudes | 0.028* |
| Asociación lineal por lineal | 0.029* |

* significancia estadística $p < 0.05$

Lo que podemos observar en la tabla 9 es que 16 pacientes (19.5%) que respondieron adecuadamente en la Toma 1, lo hicieron en la Toma 2. De igual manera 37 pacientes (45.1%) de los “no respondedores” en la Toma 1, siguieron así en la Toma 2. Pero hay un porcentaje importante de pacientes que no se comportaron de la misma manera en las dos tomas: 14 pacientes (17.1%) de los buenos respondedores en la Toma 1 se comportaron como “no respondedores” en la Toma 2; 15 pacientes (18.3%) considerados como “no respondedores” en la Toma 1, se comportaron como buenos respondedores en la Toma 2. Es decir, hay un grupo importante de pacientes (aproximadamente 1/3) que migraron de una clasificación a otra, encontrándose esta variación como no natural con una significancia estadística comprobada por varias pruebas, como lo muestra la tabla 9.

Utilizando el punto de corte de Barragán y colaboradores (Barragán P, 2003) donde un $IRP_{VASP} \geq 50\%$ definió a los “no respondedores al Clopidogrel”, se observó en el presente trabajo, que el 60% de los pacientes bajo tratamiento al Clopidogrel durante la Toma 1 y 62% durante la Toma 2, no presentaron una respuesta adecuada al antiplaquetario, un porcentaje más alto a lo reportado en otros estudios (De Miguel Antonio, 2008) (Ait-Mohktar O, 2012) (Angiolillo D, Ferreiro 2010). Solamente el 40% de los pacientes durante la Toma 1 y 38% de los pacientes durante la Toma 2 respondieron adecuadamente al antiplaquetario. De los 90 pacientes estudiados, hasta la impresión de este trabajo, solamente se observó la presencia de ECCVM (muerte cardiovascular, trombosis del stent, reinfarto, revascularización, embolia o derrame cerebral) en 4 pacientes, 11 pacientes no presentaron ningún síntoma hasta el momento, 3 presentaron otro tipo de complicaciones y de 72 pacientes se desconoce evolución.

Dado que el valor actual del punto de corte del IRP_{VASP} que define a los “no respondedores” es controversial y que en la población estudiada se presenta un alto porcentaje de pacientes que no respondieron de manera adecuada al tratamiento pero que no se pudo comprobar un mal pronóstico en ellos, nuestro grupo de trabajo sugiere que los pacientes que presentan un $IRP_{VASP} \geq 50\%$, sean subclasificados de la siguiente manera: pacientes con un $50\% \leq IRP_{VASP} < 70\%$ se cataloguen como pacientes con *Alta Reactividad Plaquetaria En Tratamiento (ARPET)* y pacientes con un $IRP_{VASP} \geq 70\%$ sean considerados como “no respondedores”. Tomando en cuenta esta clasificación se observa un 24.4% de no respondedores en la Toma 1 y 32.9% en la Toma 2. Estos resultados se muestran en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Resultados de IRP Toma 1, considerando tres grupos de IRP.

| Resultados IRP Toma 1 | | | |
|------------------------------|---|-----------|------------|
| Valor de IRP | Clasificación | n | % |
| < 50% | Buenos respondedores al Clopidogrel | 34 | 37.8 |
| 50 - 70% | Alta reactividad plaquetaria en tratamiento | 34 | 37.8 |
| ≥ 70% | No respondedores al Clopidogrel | 22 | 24.4 |
| Total | | 90 | 100 |

Tabla 11. Resultados de IRP Toma 2, considerando tres grupos de IRP.

| Resultados IRP Toma 2 | | | |
|------------------------------|---|-----------|------------|
| Valor de IRP | Clasificación | n | % |
| < 50% | Buenos respondedores al Clopidogrel | 28 | 34.1 |
| 50 - 70% | Alta reactividad plaquetaria en tratamiento | 27 | 32.9 |
| ≥ 70% | No respondedores al Clopidogrel | 27 | 32.9 |
| Total | | 82 | 100 |

Se asociaron las variables de estudio con el IRP mediante la prueba de chi cuadrada, ahora subdividiendo la población de acuerdo a los tres grupos de IRP sugeridos. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 12. Distribución de los pacientes de acuerdo al IRP (<50%, 50 – 70% y ≥70%) en las distintas variables de estudio y su significancia.

| | IRP Toma 1 | | | | IRP Toma 2 | | | |
|--|---------------|-------------------|---------------|-------------------------|---------------|-------------------|----------------|--------------------------|
| | <50% n (%) | 50 - 70% n (%) | ≥70% n (%) | Sig. (bilateral) | <50% n (%) | 50 - 70% n (%) | ≥ 70% n (%) | Sig. (bilateral) |
| Angioplastia | | | | | | | | |
| Sí | 23 (25.6) | 26 (28.9) | 12 (13.3) | 0.372 (X ²) | 21 (25.6) | 18 (22.0) | 17 (20.7) | 0.758 (X ²) |
| No | 13 (14.4) | 8 (8.9) | 8 (8.9) | | 9 (11.0) | 7 (8.5) | 10 (12.2) | |
| Antecedentes de enfermedad cardiovascular | | | | | | | | |
| Sí | 18 (20.0) | 13 (14.4) | 11 (12.2) | 0.673 (X ²) | 14 (17.1) | 13 (15.9) | 13 (15.9) | 0.875 (X ²) |
| No | 16 (17.8) | 20 (22.2) | 8 (8.9) | | 15 (18.3) | 11 (13.4) | 14 (17.1) | |
| Tabaquismo | | | | | | | | |
| Sí | 22 (24.4) | 18 (20.0) | 12 (13.3) | 0.721 (X ²) | 15 (18.3) | 17 (20.7) | 16 (19.5) | 0.556 (X ²) |
| No | 14 (15.6) | 15 (16.7) | 7 (7.8) | | 14 (17.1) | 7 (8.5) | 11 (13.4) | |
| Dislipidemia | | | | | | | | |
| Sí | 26 (28.9) | 18 (20.0) | 11 (12.2) | 0.226 (X ²) | 24 (29.3) | 11 (13.4) | 16 (19.5) | 0.017* (X ²) |
| No | 8 (8.9) | 13 (14.4) | 5 (5.6) | | 4 (4.9) | 10 (12.2) | 11 (13.4) | |
| Hipertensión | | | | | | | | |
| Sí | 25 (27.8) | 25 (27.8) | 16 (17.8) | 0.294 (X ²) | 25 (30.5) | 16 (19.5) | 19 (23.2) | 0.340 (X ²) |
| No | 11 (12.2) | 9 (10.0) | 3 (3.3) | | 5 (6.1) | 8 (9.8) | 8 (9.8) | |
| Genética | | | | | | | | |
| AA (Homocigoto CYP2C19*2) | 0 (0) | 1 (1.9) | 1 (1.9) | 0.300 (X ²) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (3.9) | 0.088 (X ²) |
| GA (Heterocigoto CYP2C19*2) | 3 (5.9) | 2 (3.9) | 2 (3.9) | | 3 (5.9) | 2 (3.9) | 2 (3.9) | |
| GG (Normal) | 16 (31.3) | 13 (25.5) | 13 (25.5) | | 9 (17.6) | 13 (25.5) | 16 (31.4) | |
| Diabetes | | | | | | | | |
| Sí | 18 (20.0) | 23 (25.6) | 8 (8.9) | 0.113 (X ²) | 20 (24.4) | 11 (13.4) | 15 (18.3) | 0.241 (X ²) |
| No | 18 (20.0) | 11 (12.2) | 12 (13.3) | | 10 (12.2) | 14 (17.1) | 12 (14.6) | |
| Complicaciones | | | | | | | | |
| ECCVM | 2 (2.2) | 1 (1.1) | 1 (1.1) | 0.315 (X ²) | 2 (2.4) | 0 (0) | 1 (1.2) | 0.085 (X ²) |
| Otras complicaciones | 2 (2.2) | 0 (0) | 1 (1.1) | | 3 (3.7) | 0 (0) | 0 (0) | |
| Asintomático | 4 (4.4) | 2 (2.2) | 5 (5.6) | | 4 (4.9) | 6 (7.3) | 1 (1.2) | |
| Se desconoce evolución | 28 (31.1) | 31 (34.4) | 13 (14.4) | | 21 (25.6) | 19 (23.2) | 25 (30.5) | |
| Diagnóstico | | | | | | | | |
| SCA | 23 (25.6) | 24 (26.7) | 13 (14.4) | 0.413 (X ²) | 19 (23.2) | 18 (9.8) | 17 (20.7) | 0.627 (X ²) |
| Angor estable | 9 (10.0) | 10 (11.1) | 5 (5.6) | | 8 (9.8) | 7 (8.5) | 8 (9.8) | |
| Isquemia silente | 4 (4.4) | 0 (0) | 2 (2.2) | | 3 (3.7) | 0 (0) | 2 (2.4) | |
| Género | | | | | | | | |
| Hombres | 30 (33.3) | 24 (26.7) | 17 (18.9) | 0.319 (X ²) | 23 (28) | 21 (25.6) | 19 (23.2) | 0.508 (X ²) |
| Mujeres | 6 (6.7) | 10 (11.1) | 3 (3.3) | | 7 (8.5) | 4 (4.9) | 8 (9.8) | |

X²= prueba de asociación para variables discretas chi cuadrada, n=número de pacientes, X=valor de la media, E.E.=error estándar

* significancia estadística p<0.05

Tampoco de esta manera se aprecia que las variables mostradas en dicha tabla sean determinantes en la respuesta al Clopidogrel. De nuevo se observa la significancia en la dislipidemia ($p=0.017$) aparentemente los pacientes con dislipidemia mostraron mejor respuesta al Clopidogrel, pero como lo mencionado anteriormente para aseverar esto tendríamos que conocer el comportamiento de dicha dislipidemia en los pacientes.

A diferencia de la gráfica 3, que muestra la distribución de los pacientes en el IRP de la Toma 1 y de la Toma 2 considerando la clasificación de los pacientes sólo en dos categorías y que no se observó la migración de los pacientes; considerando 3 categorías de clasificación: buenos respondedores, *ARPET* y no respondedores, sí se observa que 9 pacientes clasificados como *ARPET* en la Toma 1, cambiaron de clasificación en la Toma 2, es decir, en esta toma se clasificaron como no respondedores. Este comportamiento se muestra en el gráfico 6.

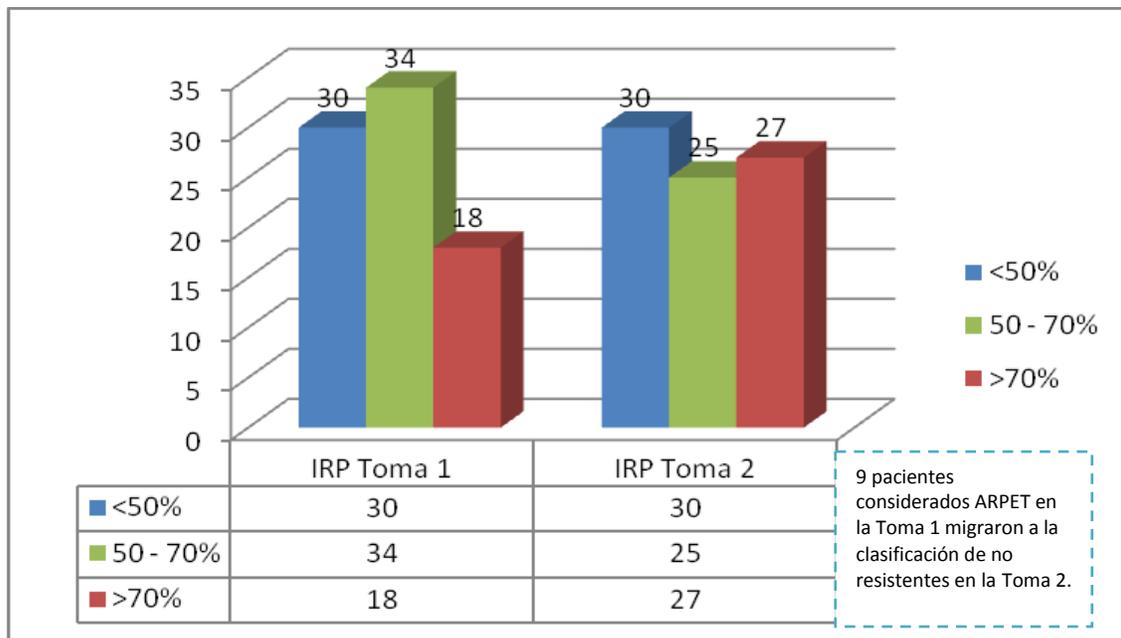


Figura 12. Distribución de buenos respondedores, intermedios y no respondedores en la Toma 1 y Toma 2

Al realizar una tabla de contingencia y conocer la distribución de los pacientes se obtuvo la siguiente tabla:

Tabla 13. Distribución de los buenos respondedores, intermedios y no respondedores en la Toma 1 y Toma 2

| | | IRP Toma 2 | | | TOTAL |
|------------|----------|------------|------------|------------|------------|
| | | < 50% | 50 - 70% | ≥ 70% | |
| IRP Toma 1 | < 50% | 15 (18.3%) | 9 (11.0%) | 6 (7.3%) | 30 (36.6%) |
| | 50 - 70% | 12 (14.5%) | 12 (14.6%) | 10 (12.2%) | 34 (41.5%) |
| | ≥ 70% | 3 (3.7%) | 4 (4.9%) | 11 (13.4%) | 18 (22.0%) |
| TOTAL | | 30 (36.6%) | 25 (30.5%) | 27 (32.9%) | |

| Pruebas de chi-cuadrada | Sig. (bilateral) |
|------------------------------|------------------|
| Chi-cuadrada de Pearson | 0.039* |
| Razón de verosimilitudes | 0.043* |
| Asociación lineal por lineal | 0.004* |

* significancia estadística $p < 0.05$

En la tabla 15, se puede apreciar que 15 pacientes (18.3%) fueron considerados como buenos respondedores en ambas tomas, 12 pacientes (14.6%) tuvieron un IRP del 50 al 70% en la Toma 1 y 2, y 11 pacientes (13.4%) se mantuvieron como “no respondedores” en ambas tomas. Lo que llama la atención los pacientes que migraron de una clasificación a otra: 9 pacientes (11.0%) considerados como buenos respondedores en la Toma 1 se comportaron como *ARPET* en la Toma 2; y 6 (7.3%) fueron considerados como “no respondedores” en la Toma 2. De los pacientes considerados como *ARPET* en la Toma 1: 12 (14.5%) fueron buenos respondedores en la Toma 2 y 10 (12.2%), “no respondedores”. Y finalmente de los no respondedores en la Toma 1: 3(3.7%) fueron buenos respondedores en la Toma 2 y 4 (4.9%) fueron *ARPET*. Al igual que en la tabla 8, se observa una variación no natural de los pacientes que migraron a otra clasificación en alguna de las dos tomas y esto se puede apreciar

mediante las pruebas de chi cuadrada de Pearson ($p=0.039^*$), razón de verosimilitudes ($p=0.043^*$) y asociación lineal por lineal ($p=0.004^*$).

De esta manera, creemos que los pacientes que presentan esta migración de grupos en las dos tomas, son un grupo interesante para darles seguimiento y para futuros trabajos de investigación.

Creemos que estas categorías sugeridas clasifican de mejor manera al grupo amplio de los no respondedores y proporcionan información sobre si el antiplaquetario está funcionando en forma adecuada, si está funcionando medianamente o simplemente su funcionalidad es nula. Respecto a la utilización del IRP_{VASP} como herramienta de ajuste en el tratamiento antiplaquetario, una propuesta de Bonello y colaboradores (2008) (Bonello L C.-J. L., 2008) es ajustar la dosis de Clopidogrel en los pacientes no respondedores ($IRP_{VASP} \geq 50\%$) monitoreando el IRP_{VASP} del paciente hasta obtener un $IRP_{VASP} < 50\%$ y de esta manera reducir significativamente el número de ECCVM. Sin embargo se necesita más estudios al respecto.

6.3 Identificación del CYP2C19*2

Se extrajo el ADN de 51 pacientes con enfermedad arterial coronaria. En la figura 12 se observa el gel de agarosa al 1% donde muestra el ADN extraído de los pacientes.

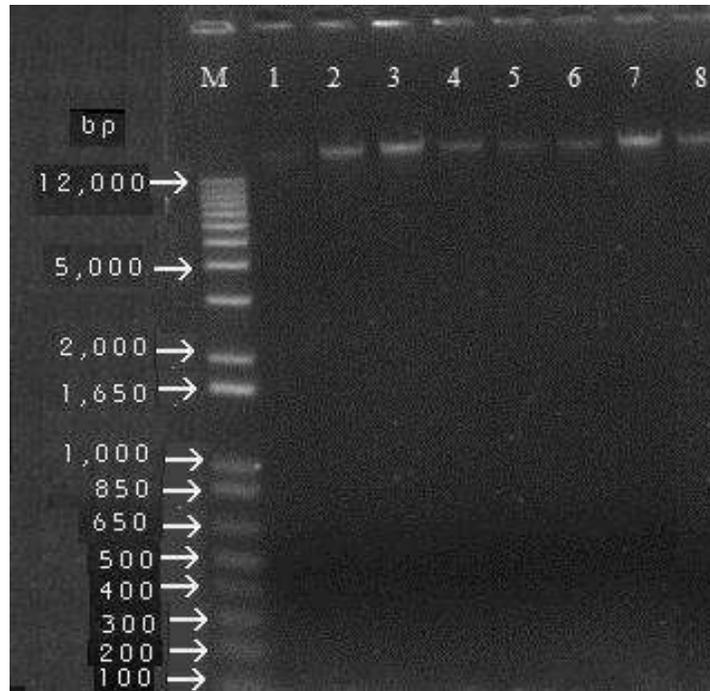


Figura 13. ADN extraído de muestras sanguíneas de los pacientes incluidos en el estudio

Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra los carriles: M, marcador de peso molecular Invitrogen 1 Kb plus DNA Ladder; 1 – 8, ADN extraído de las muestras 1 – 8.

Se amplificó la secuencia de interés de las 51 extracciones de ADN obtenidas que contenía el polimorfismo CYP2C19*2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa, obteniendo un producto de amplificación de 316 pb. La figura 13 muestra el gel de agarosa al 2% en donde se observa el producto de amplificación obtenido.

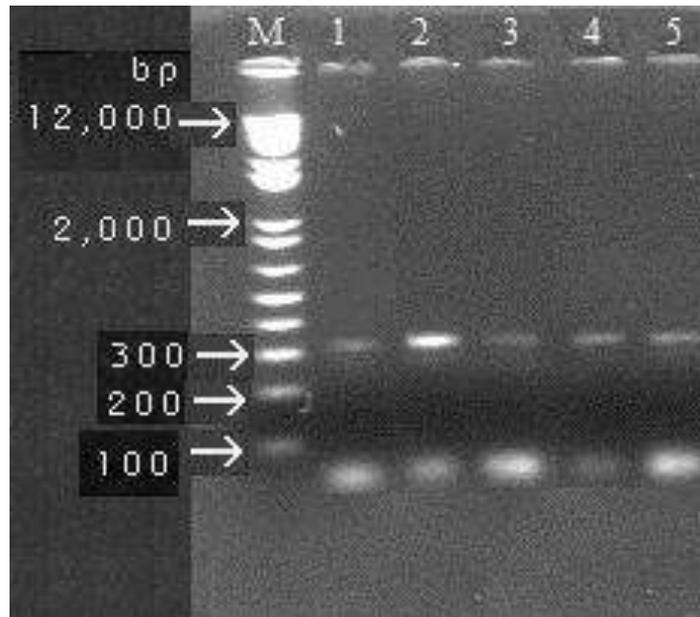


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante PCR de muestras sanguíneas de los pacientes incluidos en el estudio.

M, marcador de peso molecular Invitrogen 1 Kb plus DNA Ladder, 1 – 5 ADN extraído de las muestras 1 – 5.

Mediante la digestión del producto de amplificación con la enzima de restricción *SmaI* se identificó la presencia de CYP2C19*2. La presencia de un fragmento intacto de tamaño de 316 pb en el gel de agarosa al 1% determinó la presencia del polimorfismo (AA), por el contrario, la presencia de dos fragmentos, uno de 109 pb y el otro de 207 pb, determinaron la ausencia del polimorfismo (GG). En aquellos casos en los que se pudo observar tres fragmentos, se demostró su carácter heterocigoto, es decir en un alelo había el polimorfismo, y en el otro no. (GA)

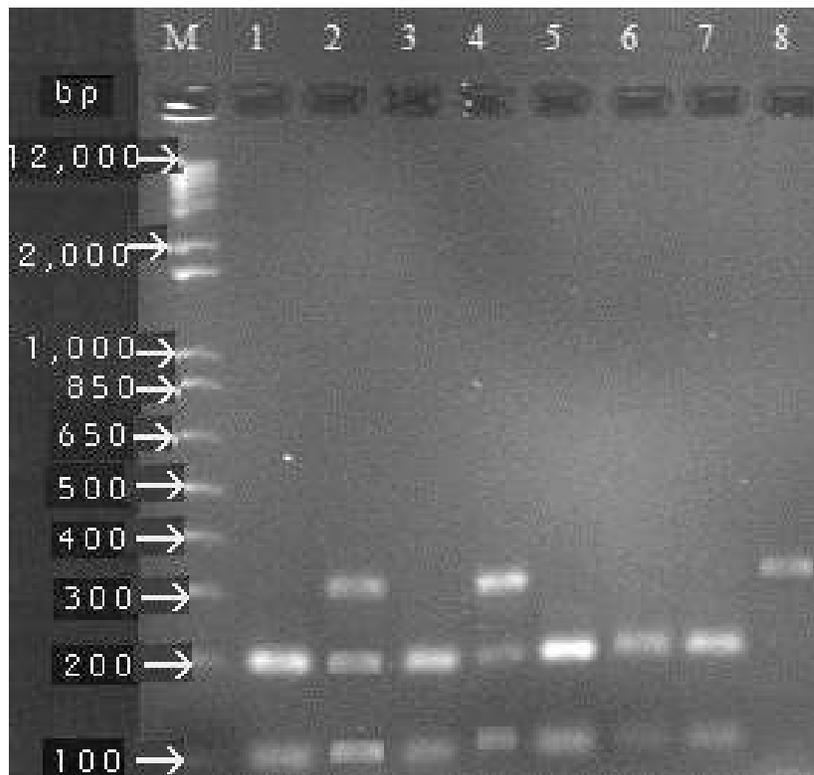


Figura 15. Digestión de los fragmentos amplificados a partir de ADN de muestras sanguíneas de los pacientes incluidos en el estudio.

M, marcador de peso molecular Invitrogen 1 Kb plus DNA Ladder, 1 – 8 ADN extraído de las muestras. Muestras 2 y 4 son heterocigotas para el polimorfismo CYP2C19*2. Muestra 8 es homocigotas para CYP2C19*2.

De los pacientes estudiados, 9 (17%) presentaron la mutación: 7 (13.7%) fueron heterocigotos (GA) y 2 pacientes (3.9%) fueron homocigotos (AA) para el polimorfismo de CYP2C19*2; 42 pacientes (82.4%) no mostraron mutación en ninguno de los alelos del gen CYP2C19 (GG). Los pacientes que tienen la mutación del gen CYP2C19 se presume que presentan un fenotipo de metabolización pobre en el caso de los homocigotos (AA) e intermedio, en el caso de los heterocigotos (GA) (Rodríguez-Arcasa MJ, 2011) (Zand N, 2005) (Cuisset T, 2011) Analizando los resultados de IRP obtenidos en estos pacientes, observamos que en el caso de los pacientes que presentaron el polimorfismo (AA o GA) el promedio del IRP Toma 1 fue de 52.41% y del IRP Toma 2 fue de 64.35%; y en los pacientes que no presentaron mutación del gen (GG) estos valores fueron de 57.3% y de 62.46% ± respectivamente. Estos resultados se resumen en la tabla 8.

Al contrastar mediante la prueba t de Student los pacientes sin polimorfismo (GG) con los pacientes que lo presentaban (GA ó AA) con el valor promedio del IRP de la Toma 1 no se observó diferencia significativa ($p=0.577$). Tampoco se observó diferencia significativa al contrastar con el IRP de la Toma 2 ($p=0.801$). Por lo que la presencia de CYP2C19*2 no influyó en la reactividad plaquetaria en ninguna de las dos tomas. (Tabla 8)

Tabla 14. Frecuencia de la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 y valor del IRP.

| Gen | Cambio de nucleótido | Frecuencia en genotipo | Fenotipo metabolizador | % IRP Toma 1 (X ± E.E.) | Sig. (bilateral) | % IRP Toma 2 (X ± E.E.) | Sig. (bilateral) |
|---------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| CYP2C19 | Ninguno | GG (42) 82.4% | Normal | 57.3 ± 3.3 | 0.577 (t) | 62.46 ± 3.1 | 0.801 (t) |
| | CYP2C19*2 681 G>A (rs4244285) | GA / AA (9) 17% | Intermedio y pobre | 52.41 ± 10.6 | | 64.35 ± 7.2 | |

t= prueba de contraste paramétrica t de student, n=número de pacientes, X=valor de la media, E.E.=error estándar, *significancia estadística p<0.05

La variabilidad que se observa entre el IRP de la Toma 1 y de la Toma 2 tanto en los pacientes sin polimorfismo como en los pacientes que lo presentan, es una variabilidad natural ($p>0.05$) como se puede apreciar en la tabla 9.

Tabla 15. Valor promedio de IRP Toma 1 y 2 y la presencia del polimorfismo CYP2C19*2

| Genotipo | Variable | (X ± E.E.) | Sig. (bilateral) |
|----------|-------------|--------------|------------------|
| GG | %IRP Toma 1 | 57.3 ± 3.3 | 0.182 (t) |
| | %IRP Toma 2 | 62.46 ± 3.1 | |
| GA/AA | %IRP Toma 1 | 52.41 ± 10.6 | 0.092 (t) |
| | %IRP Toma 2 | 64.35 ± 7.2 | |

t=prueba de contraste t de student para variables relacionadas

X=valor de la media, E.E.=error estándar, *significancia estadística p<0.05

En los siguientes gráficos 3 y 4 se muestra la relación entre el genotipo de los pacientes y su respuesta al antiplaquetario mostrado como %IRP tanto de la Toma 1 como de la Toma 2.

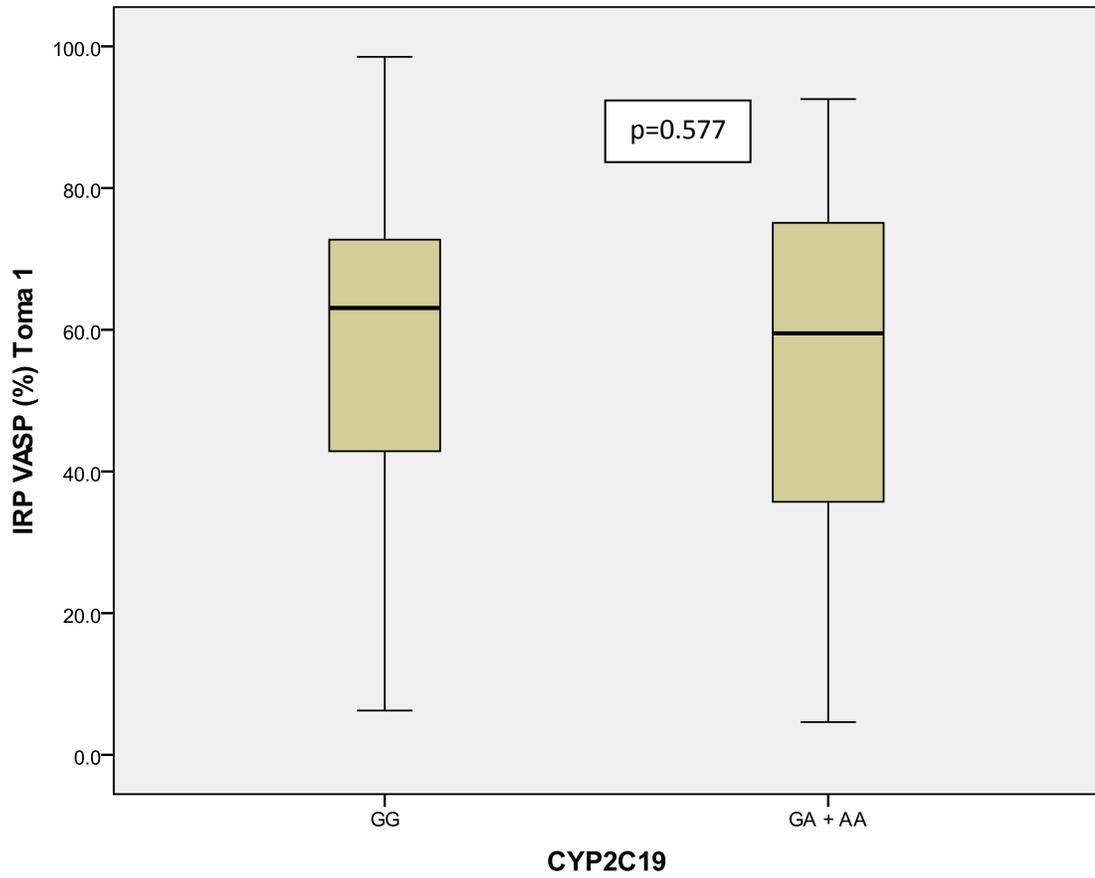


Figura 16. Efecto del genotipo CYP2C19 en el valor de IRP de la Toma 1

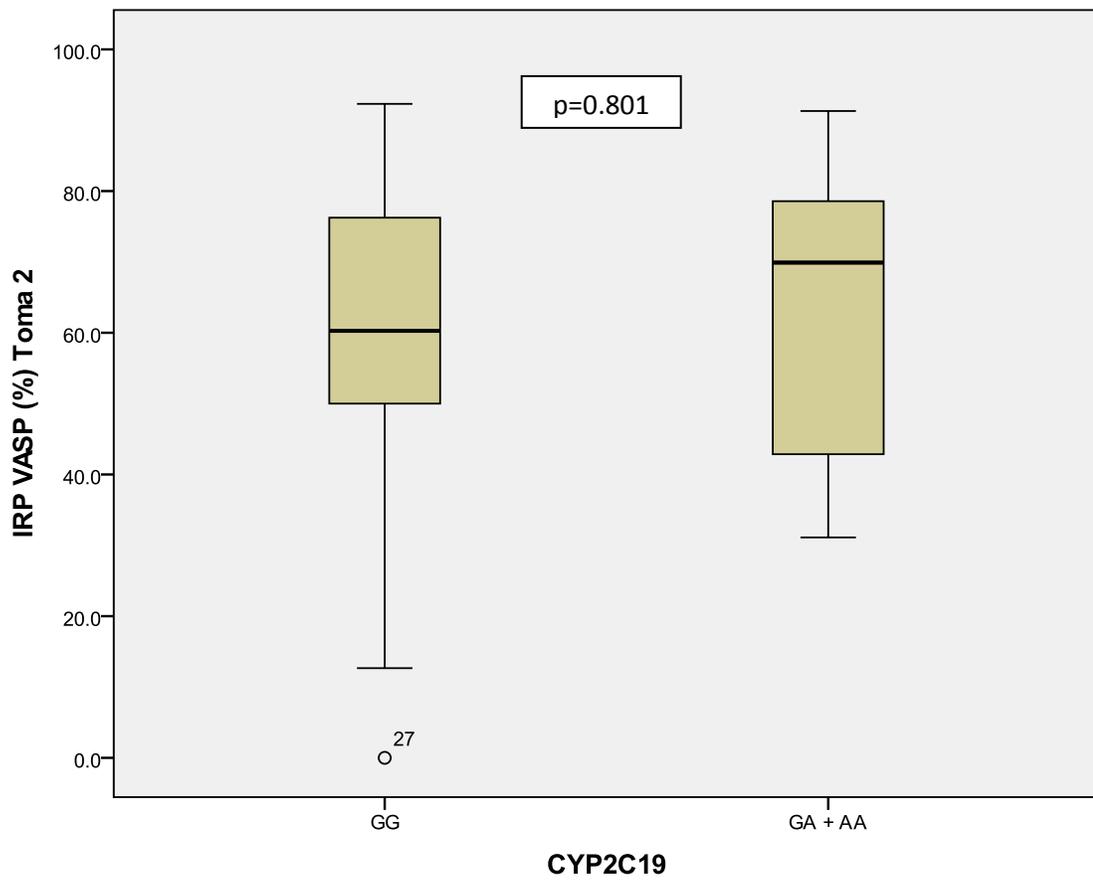


Figura 17. Efecto del genotipo CYP2C19 en el valor de IRP de la Toma 2

7 DISCUSION

En el presente estudio se observa una amplia variabilidad en la respuesta a Clopidogrel, mayor a lo reportado por diversos grupos de trabajo (5 - 46%) (De Miguel Antonio, 2008) (Ait-Mohktar O, 2012) (Angiolillo D, Ferreiro 2010): 60% en la Toma 1 y 62% en la Toma 2 no responden adecuadamente al Clopidogrel (IRP \geq 50%). Son varios los estudios que relacionan una menor respuesta al Clopidogrel, con mayor probabilidad de sufrir eventos adversos a largo plazo. (De Miguel Antonio, 2008). De ahí la importancia de identificar a este grupo de pacientes que no responden de manera adecuada al Clopidogrel y que estarían en alto riesgo de ECCVM. Sin embargo en el presente trabajo debido a que el número de eventos adversos fue muy pequeño, no se pudo comprobar que la alta reactividad plaquetaria fuera la responsable de los eventos adversos ni el valor predictivo del IRP para ellos. ($p=0.764$ en la Toma 1 y $p=0.0.092$ en la Toma 2). (Tabla 7).

En este estudio se evaluó la fosforilación de VASP por citometría de flujo utilizando el ensayo estandarizado de Biocytex, Asnieres, Francia, el cual es una adaptación del método de Schwarz y colaboradores (1999) (Schwarz UR, 1999). Esta metodología permite medir el grado de inhibición del receptor plaquetario P2Y12 y por tanto relaciona directamente con la eficacia de las tienopiridinas como el Clopidogrel. (Morris A, 2009) (Aleil B, 2005) Aleil y colaboradores (2005) sugieren que el análisis de la fosforilación de VASP por citometría de flujo da resultados muy confiables lo que la hace una prueba muy conveniente para estudios clínicos de evaluación de la respuesta a antiplaquetarios. Este

ensayo presenta una alta sensibilidad y especificidad para monitorear el tratamiento con Clopidogrel en pacientes con ECV. (Cayla G, 2008)

Debido a que no existe un punto de corte de IRP estandarizado, nuestro grupo de trabajo sugiere la subclasificación de los pacientes que presentaban un $IRP_{VASP} \geq 50\%$, en un grupo intermedio de 50 – 70% con características de *Alta Reactividad Plaquetaria En Tratamiento (ARPET)* y aquéllos con un $IRP \geq 70\%$. Creemos que de esta manera nos da una visión más amplia del comportamiento del grupo grande de pacientes que presentan un $IRP_{VASP} \geq 50\%$, y subclasifica a éstos en los que, si bien no tuvieron una respuesta óptima ($IRP_{VASP} < 50\%$) si presentaron un grado de inhibición plaquetaria ($50\% \leq IRP_{VASP} < 70\%$) y en los que no respondieron al Clopidogrel, ya que presentaron un alto porcentaje de plaquetas activas a pesar de estar bajo tratamiento antiplaquetario. Creemos que es importante identificar a estas dos subpoblaciones porque le podría dar al clínico información relevante de la respuesta del paciente al antiplaquetario y proporcionarle herramientas para sugerir algún ajuste en la dosis del fármaco si éste no estuviera respondiendo lo suficiente o la posibilidad de cambiar de antiplaquetario si existiera nula inhibición con el Clopidogrel. De manera semejante en los trabajos de Cayla y colaboradores (2008) (Cayla G, 2008) y Matetzky y colaboradores (2004) (Matetzky S, 2004) clasifican la población en cuartiles de acuerdo al valor del IRP, y definen como “no respondedores” a los pacientes que se encuentran en el cuarto cuartil ($IRP = 75 - 100\%$)

De acuerdo con las tres categorías sugeridas, los resultados en el presente estudio obtenidos fueron en la Toma 1: buenos respondedores 40%, *ARPET* 38% y no respondedores 22%. En la Toma 2, se obtuvo: buenos respondedores 33%, *ARPET* 28% y

no respondedores 30%. Lo que se puede apreciar es que el 62% de los pacientes en la Toma 1 que están por arriba del punto de corte $IRP_{VASP} \geq 50\%$ no se comportaron todos de la misma forma: hubo un 38% que sí respondió de alguna manera al Clopidogrel (el IRP en ellos revela un grado de inhibición plaquetario: $50\% \leq IRP_{VASP} < 70\%$) y hubo un 24% de pacientes que realmente en ellos el efecto del Clopidogrel fue nulo, ya que sus plaquetas se encontraron activas por arriba del 70%. En la Toma 2, se obtuvo similar comportamiento en cuanto a los porcentajes, sin embargo a las 24 horas de la ingesta de la dosis de carga del Clopidogrel se presentan mayor número de “no respondedores”. Esto puede deberse a que a las 24 horas se reduce la dosis del antiplaquetario (75 mg/día) con respecto a la dosis de carga que fue de 300 mg.

La variabilidad interindividual en la respuesta a Clopidogrel es multifactorial. Depende de factores clínicos, celulares y genéticos. En el presente estudio no se encontró ninguna relación de la alta reactividad plaquetaria con la presencia de diabetes, hipertensión arterial, tabaquismo, edad, género, IMC, dislipidemia, realización de angioplastía o antecedentes heredofamiliares como se muestra en las tablas 4, 7 y 12. Lo que supone que el problema de la amplia variabilidad al antiplaquetario es bastante complejo.

Dado que el metabolito activo del Clopidogrel requiere para su transformación a enzimas hepáticas de la familia del Citocromo P450, específicamente de la subfamilia CYP2C19, se ha sugerido en muchos estudios una relación entre los no respondedores y la presencia de polimorfismos en estas isoenzimas, específicamente el CYP2C19*2. (Yukhnyan L, 2011) (Shuldiner A, 2009) (Pettersen A, 2011) (Umemura K, 2008)

Bonello y colaboradores reporta en su estudio del 2010, 35.3% de sus pacientes presentan el polimorfismo (GA y AA) y encontró relación entre los portadores de este SNP y una alta reactividad plaquetaria. Cabe destacar que el tamaño de su muestra fue de 411 pacientes, de los cuales 134 fueron portadores del polimorfismo y de éstos, 103 presentaron un IRP $\geq 50\%$, es decir exhibieron alta reactividad plaquetaria. (Bonello L A. S.-M.-B.-G.-J., 2010) En 2012, Bonello y colaboradores reportan en su trabajo que hay una clara asociación entre CYP2C19 con la alta reactividad plaquetaria que presentaron sus pacientes después de una dosis de carga de Clopidogrel de 600 mg. (Bonello L C.-J. L.-G., 2012)

En nuestro estudio la población que presentó CYP2C19*2 (GA y AA) fue de 17%, sin embargo no observamos ninguna correlación entre esta población considerada como “pobres metabolizadores” y una alta reactividad plaquetaria durante tratamiento o con una no respuesta al Clopidogrel. Esto puede deberse a que solamente realizamos la determinación del polimorfismo a 51 pacientes y se necesitaría ampliar el tamaño de la muestra. Además, en la población estudiada se observó una baja incidencia de ECCVM, por lo que no se pudo correlacionar la presencia del polimorfismo con éstos. Sin embargo, se puede apreciar en la tabla 7, que de los 9 pacientes que presentaron el polimorfismo CYP2C19*2, 6 pacientes están clasificados con un IRP $\geq 50\%$, y por tanto considerados como “no respondedores”. En la clasificación sugerida en este trabajo, 3 pacientes con polimorfismo se clasificaron como *ARPET* y otros 3 pacientes con polimorfismo fueron clasificados como no respondedores. Al observar los resultados se puede apreciar que 2 de

pacientes presentaron el polimorfismo CYP2C19*2 de forma homocigota, y ellos presentaron un IRP $\geq 50\%$.

Lo que podemos apreciar en los resultados obtenidos es que específicamente el estudio de CYP2C19*2 no nos proporciona la solución sobre el problema de la amplia variabilidad al Clopidogrel. A pesar de ser el polimorfismo más estudiado y que el fenotipo de estos pacientes muestra una pobre metabolización del fármaco, lo que explicaría la falta de respuesta de éste durante el tratamiento, se presenta en un porcentaje bastante bajo de pacientes respecto al alto porcentaje de no respondedores.

Sin embargo, como lo menciona De Labriolle y colaboradores (2011) muchos determinantes genéticos podrían estar involucrados y solo el 12% de la variación a la respuesta al Clopidogrel puede atribuirse al polimorfismo CYP2C19*2 (De Labriolle A, 2011). Por lo que aunado al estudio del CYP2C19*2, se requiere de más estudios de otros polimorfismos tanto los relacionados con las enzimas involucradas en la absorción y metabolismo del Clopidogrel, como los relacionados con el propio receptor plaquetario de este fármaco.

8 RESUMEN DE RESULTADOS

- ❖ Se determinó la prevalencia de no respondedores en población mexicana, observando una alta reactividad plaquetaria, como lo reportado en otras poblaciones.
- ❖ El análisis de la fosforilación de VASP por citometría de flujo presenta grandes ventajas técnicas comparada con la agregometría. Esta prueba se puede realizar en menos de una hora y su principal ventaja es la estabilidad de la muestra sanguínea, ya que puede ser almacenada hasta 24 horas antes de su proceso, por lo que para la práctica clínica habitual resulta muy conveniente.
- ❖ Se encontró que aproximadamente 1/3 de los pacientes presenta un IRP en la Toma 1 diferente que en la Toma 2. Encontrándose esta variabilidad como no natural ($p < 0.005$).
- ❖ Se determinó la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 en 51 de los pacientes estudiados, polimorfismo asociado con un fenotipo de pobre metabolizador del Clopidogrel.

9 CONCLUSIONES

A pesar del gran avance que presentan los medicamentos antiplaquetarios en el tratamiento y la prevención de la enfermedad arterial coronaria, exhiben aún ciertas limitaciones que dejan sin proteger a un grupo amplio de pacientes. Se observa un alto porcentaje de pacientes con un IRP $\geq 50\%$ en población mexicana, sin embargo éste no se relaciona con el número de ECCVM, ya que en esta población éstos fueron muy bajos.

La determinación del Índice de Reactividad Plaquetaria mediante el ensayo VASP/P2Y12 por citometría de flujo, permite la identificación de pacientes con baja respuesta al Clopidogrel que precisen de ajuste en la dosis o cambio de antiplaquetario con el fin de prevenir eventos adversos.

El porcentaje de la presencia de CYP2C19*2 en la población estudiada fue baja, por lo que este polimorfismo no es la única variación genética responsable de la no respuesta al Clopidogrel.

Sin embargo, la presencia de la mutación homocigota CYP2C19*2 (AA) sugiere fuertemente una baja respuesta a Clopidogrel. Se requiere de más estudios de otras variantes genéticas que también puedan contribuir a la respuesta inadecuada a este antiplaquetario.

El gran progreso en genómica está generando información relevante en cuanto a la variabilidad en la respuesta al Clopidogrel, sin embargo el polimorfismo CYP2C19*2 no es el único responsable de esta variabilidad y se requiere de más estudios de otras variantes

genéticas que también puedan contribuir a esta respuesta inadecuada al tratamiento con Clopidogrel.

10 PERSPECTIVAS

- Dado que la citometría de flujo es un método que involucra equipo costoso y un elevado nivel de complejidad en el análisis que necesita ser efectuado por personal especializado, sería necesario comparar los resultados obtenidos mediante el ensayo VASP/P2Y12 por citometría de flujo con otros métodos de evaluación de la función plaquetaria, principalmente con dispositivos a pie de cama como el Verify Now, que pudieran resultar más prácticos para la realización de estas evaluaciones.
- Realizar la determinación de otros polimorfismos relacionados con enzimas involucradas en la absorción y metabolismo del Clopidogrel, así como también del propio receptor plaquetario del ADP. (ABCB1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19*3, CYP2C19*17, etc.)
- Ampliar el tamaño de la muestra para corroborar las correlaciones encontradas: con cuenta de plaquetas, dislipidemia, y de esta última discriminar entre los tipos de dislipidemia y recabar los valores de colesterol, triglicéridos, cHDL y cLDL.
- Realizar un seguimiento a más largo plazo de los pacientes en este estudio, ya que varios de ellos presentan un seguimiento menor a 6 meses a la fecha de publicación de esta tesis, y que podría dar información relevante acerca de los eventos adversos que hasta el momento no se observaron.

- Realizar futuras investigaciones sobre los pacientes que no se comportaron de la misma manera en cuanto al IRP en la Toma 1 y en la Toma 2 y estudiar a qué se debe esta variación de la función plaquetaria en tan sólo 24 horas de diferencia entre estas tomas.

11 REFERENCIAS

Ait-Mohktar O, B. L. (2012). High on Treatment Platelet Reactivity. *Heart, Lung and Circulation* , 12-21.

Aleil B, R. C. (2005). Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 85-92.

Altman. (2010). ¿Tiene implicancias clínicas la resistencia a la aspirina y/o al clopidogrel? *Rev Fed Arg Cardiol 2010* , 1-6.

Angiolillo D, F. J. (2010). Inhibición del receptor plaquetario P2Y₁₂ de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. *Rev Esp Cardiol* , 60-76.

Angiolillo D, F.-O. A. (2007). Variability in Individual Responsiveness to Clopidogrel. *Journal of the American College of Cardiology* , 1505-1516.

Angiolillo DJ, F.-O. A. (2007). Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol.* , 49: 1505-16.

Angiolillo, D. (2009). Pruebas de función plaquetaria en la práctica clínica: ¿estamos preparados para que pasen a la primera línea? *Rev Esp Cardiol.* , 62(2):113-6.

Antonio de Miguel, C. G.-G. (2008). Implicaciones clínicas de la resistencia y/o variabilidad en la respuesta al tratamiento con aspirina y clopidogrel. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología* , 188-198.

Arzamendi D, F. X. (2006). Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Rev Esp Cardiol Supl.* , 2H-10H.

Badimon L, V. G. (2008). Enfermedad aterotrombótica coronaria: avances en el tratamiento antiplaquetario. *Rev Esp Cardiol* , 61(5):501-13.

Badimon L, V. G. (2009). Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol* , 62(10):1161-78.

- Bainey KR, L. T. (2011). Clopidogrel in acute coronary syndromes: Where are we now? *Thrombosis and Haemostasis* , 766-773.
- Barragán P, B. J. (2003). Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* , 59:295-302.
- Beitelshees AL, H. R. (2011). Pharmacogenetics and Clopidogrel Response in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Interventions. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* .
- Blindt R, S. K. (2007). The significance of vasodilator stimulated phosphoprotein for risk stratification of stent thrombosis. *Thromb Haemost* , 98:1329-34.
- Bonello L, A. S.-B.-G.-J. (2010). Clopidogrel Loading Dose Adjustment According to Platelet Reactivity Monitoring in Patients Carrying the 2C19-2 Loss of Function Polymorphism. *Journal of the American College of Cardiology* .
- Bonello L, C.-J. L. (2008). Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* , 51:1404-11.
- Bonello L, C.-J. L. (2009). Tailored clopidogrel loading dose according to platelet reactivity monitoring to prevent acute and subacute stent thrombosis. *Am J Cardiol* , 103:5-10.
- Bonello L, C.-J. L.-G. (2012). Factors associated with the failure of clopidogrel dose-adjustment according to platelet reactivity monitoring to optimize P2Y12-ADP receptor blockade. *Thrombosis Research* , 1-5.
- Bonello L, P. F.-B.-G.-J. (2007). Vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation analysis prior to percutaneous coronary intervention for exclusion of postprocedural major adverse cardiovascular events. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 1630-1636.
- Bonello L, T. U. (2010). Consensus and Future Directions on the Definition of High On-Treatment Platelet Reactivity to Adenosine Diphosphate. *Journal of the American Collage of Cardiology* , 919-33.

Cattaneo, M. (2011). Response variability to clopidogrel: is tailored treatment, based on laboratory testing, the right solution? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 10:327-336.

Cayla G, M. J. (2008). Flow cytometric assessment of vasodilator-stimulated phosphoprotein: Prognostic value of recurrent cardiovascular events after acute coronary syndromes. *Archives of Cardiovascular Disease* , 743-751.

Celis JJ, C.-P. A. (2010). Prevención de la Enfermedad Cerebrovascular: uso de tienopiridinas. *Acta Neurol Colomb* .

Chitaley K, C. L. (2004). Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase C. *Federation of European Biochemical Societies* , 211-215.

Combescure C, F. P.-P. (2010). Clinical implications of clopidogrel non-response in cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 923-933.

Cuisset T, Q. J. (2011). Usefulness of High Clopidogrel Maintenance Dose According to CYP2C19 Genotypes in Clopidogrel Low Responders Undergoing Coronary Stenting for Non ST Elevation Acute Coronary Syndrome. *The American Journal of Cardiology* .

De Labriolle A, D. J. (2011). Genotypic and Phenotypic Assessment of Platelet Function and Response to P2Y12 Antagonists. *Curr Cardiol Rep* , 13:439-450.

De Miguel Antonio, C. G.-G. (2008). Implicaciones clínicas de la resistencia y/o variabilidad en la respuesta al tratamiento con aspirina y clopidogrel. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología* , 188-198.

DietmarTrenk D, H. W. (2008). 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. *Journal of the American College of Cardiology* , 1925–34.

Erlinge D, V. C. (2008). Patients with poor responsiveness to thienopyridine treatment or with diabetes have lower levels of circulating active metabolite, but their platelets respond normally to active metabolite added ex vivo. *Journal of the American College of Cardiology* , 1968-77.

Fernández-Ortiz A, A. D. (2006). Antiagregación oral e intervencionismo coronario percutáneo. *Rev Esp Cardiol Supl* , 49H-56H.

Fernando H, D. A. (2011). Proton pump inhibitors, genetic polymorphisms and response to clopidogrel therapy. *Thrombosis and Haemostasis* , 933-944.

Ferreiro JL, A. D. (2009). Clopidogrel response variability: current status and future directions. *Thromb Haemost.* , 102:7-14.

Florenzano. (2000). Fisiopatología de la placa aterosclerótica.

Fukushima-Uesaka H, S. Y. (2005). Genetic Variations and Haplotypes of CYP2C19 in a Japanese Population. *Drug Metab. Pharmacokinet* , SNP27 (300) - SNP34 (307).

Geisler T, L. H. (2006). Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *European Heart Journal* , 27:2420–2425.

Genecards. (s.f.). Recuperado el 15 de Mayo de 2012, de <http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc-bin>

Gurbel PA, B. K. (2009). The effect of elinogrel on high platelet reactivity during dual antiplatelet therapy and the relation to cyp 2c19*2 genotype: first experience in patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 43-53.

Gurbel PA, T. U. (2011). Clopidogrel response variability and the advent of personalised antiplatelet therapy. *Thrombosis and Haemostasis* , 265-270.

Hochholzer W, T. D.-B. (2010). Impact of Cytochrome P450 2C19 Loss-of-Function Polymorphism and of Major Demographic Characteristics on Residual Platelet Function After Loading and Maintenance Treatment With Clopidogrel in Patients Undergoing Elective Coronary Stent Placement. *Journal of the American College of Cardiology* , 2427–34.

<http://www.sinais.salud.gob.mx>. (2012).

Huber. (2010). Genetic variability in response to clopidogrel therapy: clinical implications. *European Heart Journal* , 2974-2976.

Hulot JS, B. A. (2006). Cytochrome P450 2C19 loss of function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* , 2244-2247.

Ibanez B., V. G. (2007). Plaque progression and regression in atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 292–299.

Inger Johansson, M. I.-S. (2011). Genetic Polymorphism and Toxicology With Emphasis on Cytochrome P450. *Toxicological Sciences* , 1-13.

Iris Müller, F. B. (2003). Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* , 787-7.

Jerjes-Sanchez Díaz C, C.-N. A.-R.-S.-C. (2006). Marcadores en la estratificación de los síndromes coronarios agudos. *Archivos de Cardioogia de México* , S2:241-248.

Lahoz C, M. J. (2007). La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol*, 60(2):184-95.

Lordkipanidzé, M. (2011). Why an aspirin a day no longer keeps the doctor away. *Thrombosis and Haemostasis* , 209-210.

Martínez Murillo C., Q. G. (2008). *Hemostasia y Trombosis*. México D.F.: Prado.

Matetzky S, S. B. (2004). Clopidogrel Resistance Is Associated With Increased Risk of Recurrent Atherothrombotic Events in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* , 109:3171-3175.

Mega J, S. T. (2011). Reduce-Function CYP2C19 Genotype and Risk of Adverse Clinical Outcomes Among Patients Treated With Clopidogrel Predominantly for PCI. A Meta-analysis. *Journal of American Medical Association* , 1821-1830.

Morris A, A.-C. B. (2009). Platelet function analysis: A comparison of methods. *doi:10.1016/j.ijcard.2009.10.037* .

Pettersen A, A. H. (2011). The influence of CYP 2C19*2 polymorphism on platelet function testing during single antiplatelet treatment with clopidogrel. *Thrombosis Journal* , 1-9.

Puddu P, M. A. (2009). The complexity of platelet metabolism and its contribution to atherothrombosis. *Acta Cardiol* , 64(2): 157-165.

Rivera J, N.-N. L. (2007). Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria. *Haematologica/edición española* , 48-62.

Rodríguez-Arcas MJ, G.-J. E.-M.-Z. (2011). Papel del citocromo P450 en la farmacocinética y en la farmacogenética de los fármacos antihipertensivos. *Farmacía Hospitalaria* , 84-92.

Rodríguez-Arcasa MJ, G.-J. E.-M. (2011). Papel del citocromo P450 en la farmacocinética y en la farmacogenética de los fármacos antihipertensivos. *Farm Hosp.* , 35(2):84—92.

Sambrook J, R. D. (2001). En *Molecular cloning: a laboratory manual*. . Nueva York: Cold Spring Harbor.

Schwarz UR, G. J. (1999). Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets - definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* , 82:1145-52.

Shuldiner A., O. J. (2009). Association of Cytochrome P450 2C19 Genotype With the Antiplatelet Effect and Clinical Efficacy of Clopidogrel Therapy. *Journal of American Medical Association* , 849 - 858.

Sibbing D, B. R. (2011). High platelet reactivity and clinical outcome - Fact and fiction. *Thrombosis and Haemostasis* , 191-202.

Silber S, A. P. (2005). Guías de Práctica Clínica sobre intervencionismo coronario. *Rev Esp Cardiol* . , 679-728.

Thomas Cuisset, J. Q.-E.-C. (2011). Usefulness of High Clopidogrel Maintenance Dose According to CYP2C19 Genotypes in Clopidogrel Low Responders Undergoing Coronary Stentint for Non ST Elevation Acute Coronary Syndrome. *The American Journal of Cardiology* .

Tortora G, D. B. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología*. México, D.F.: Médica Panamericana S.A. de C.V.

Umemura K, F. T. (2008). The common gene variants of CYP2C19 affect pharmacokinetics and pharmacodynamics in an active metabolite of clopidogrel in healthy subjects. *J Thromb Haemost* , 6:1439-41.

Van-Werkum J, T.-B. J. (2008). Platelet reactivity as a risk-factor for stent thrombosis: can this be one of the currently available appropriate methods to determine platelet reactivity? *EuroIntervention Supplement* , 4:C11-C16.

Velázquez Monroy O, B. A.-R. (2007). Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México.2005. *Archivos de Cardiología de México* , 31-39.

Wentworth J, P. G. (2006). Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem. J.* , 393, 555–564 .

Yukhanyan L, F. M.-M. (2011). Genetic variability in response to clopidogrel therapy and its clinical implications. *Thrombosis and Haemostasis Supplement* , S55-S59.

Zand N, T. N. (2005). Allele Frequency of CYP2C19 Gene Polymorphisms in a Healthy Iranian Population. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* , 4:124-128.

Zand N, T. N. (2006). Allele Frequency of CYP2C19 Gene Polymorphisms in a Healthy Iranian Population. *IRANIAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* , 124 - 128.

Zuern CS, S. M. (2011). Platelet pharmacogenomics. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 1147-1158.

12 ANEXOS

11.1 *Material, reactivos y equipos*

a) Análisis de fosforilación de VASP por citometría de flujo

Kit PLT VASP/P2Y12 (Biocytex, France)

| Reactivos | Material y equipos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Reactivo 1: Disolvente ▪ Reactivo 2a: PGE₁ ▪ Reactivo 2b: PGE₁ + ADP ▪ Reactivo 3: Fijador ▪ Reactivo 4a: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-VASP-P + permeabilizante ▪ Reactivo 5: Anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con FITC) + reactivo de detección plaquetaria marcado con PE (anti CD61-PE) + permeabilizante | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aparato de agitación tipo Vórtex ▪ Cronómetro ▪ Citómetro ▪ Tubos de hemólisis para citometría ▪ Gradilla para tubos de hemólisis ▪ Agua destilada, agua desionizada o agua para preparaciones inyectables ▪ Pipetas graduables con puntas desechables (10 µL) ▪ Pipetas (1 y 2 mL) ▪ Guantes |

b) Extracción de ADN

| Reactivos | Material y equipos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tris – HCl 1M pH 8.0 ▪ SDS 10% ▪ NaCl 5 M ▪ EDTA 0.5 M pH 8.0 ▪ Fenol – cloroformo (1:1 v/v) saturado con TE ▪ Isopropanol ▪ Etanol absoluto ▪ Agua desionizada estéril | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tubos secos con resina ▪ Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL ▪ Micropipetas ▪ Puntas para micropipetas ▪ Gradilla para tubos de microcentrífuga ▪ Microcentrífuga ▪ Aparato de agitación tipo Vórtex ▪ Centrifuga ▪ Guantes ▪ Gradilla para microtubos de microcentrífuga de 1.5 mL |

c) Gel de electroforesis

| Reactivos | Material y equipos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ TAE ▪ Agarosa ▪ Marcador de peso molecular | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Cámara de electroforesis ▪ Fotodocumentador Chemi Doc (Bio Rad) ▪ Software Quantity one (Bio Rad) ▪ Guantes ▪ Gradilla para microtubos de microcentrífuga de 1.5 mL |

d) Amplificación de ADN

| Reactivos | Material y equipos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua estéril ▪ Amortiguador para PCR ▪ MgCl₂ ▪ dNTPs ▪ Iniciadores sentido y antisentido ▪ Template de ADN ▪ Taq polimerasa | <ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR-02-C Tubo PCR de 0.2 mL. Tapa plana ▪ Gradillas para tubo PCR de 0.2 mL ▪ Termociclador GeneAmp.PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA) ▪ Aparato de agitación tipo Vórtex |

e) Digestión con enzimas de restricción (*Sma I*)

| Reactivos | Material y equipos |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua estéril ▪ 10X Buffer – T ▪ 0.1% BSA ▪ Producto de amplificación (ADN) ▪ <i>Sma I</i> | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tubos de microcentrífuga de 0.6 mL ▪ Gradillas para tubo de microcentrífuga de 0.6 mL. ▪ Aparato de agitación. Vortex ▪ Incubadora o baño María de 30°C |

11.2 Preparación de soluciones

A) Tris – HCl

- Disolver 1 mol de Tris base (121.14 g) en 800 ml de agua desionizada.
- Permitir que la solución enfríe a temperatura ambiente antes de ajustar el pH.
- Ajustar el pH al valor deseado agregando HCl concentrado.

| pH | HCl |
|-----|-------|
| 7.4 | 70 ml |
| 7.6 | 60 ml |
| 8.0 | 42 ml |

- Ajustar el volumen de la solución a 1 litro de agua desionizada.
- Esterilizar.

B) EDTA (0.5 M, pH 8.0)

- Agregar 186.1 g de EDTA disódico a 800 mL de agua desionizada.
- Agitar vigorosamente en un agitador magnético.
- Ajustar el pH a 8.0 con NaOH (aproximadamente 20 g de NaOH)
- Esterilizar
- NOTA: Las sales disódicas de EDTA pueden no disolverse hasta que el pH de la solución es ajustada a 8.0 agregando NaOH.

C) NaCl (5 M)

- Disolver 292 g de NaCl en 800 mL de agua desionizada.
- Ajustar el volumen a 1 litro con agua desionizada.
- Esterilizar y guardar a temperatura ambiente.

D) SDS (20% w/v)

- Disolver 200 g de SDS en 900 mL de agua desionizada.
- Calentar a 68°C y agitar con un agitador magnético para ayudar a la disolución.
- Si es necesario ajustar el pH a 7.2 agregando pocas gotas de HCl concentrado.
- Ajustar el volumen a 1 litro con agua desionizada.
- No es necesaria la esterilización.

E) Regulador de lisis (Buffer de extracción de ADN)

- Tris – HCl 100 mM pH 8.0
- SDS 2%
- NaCl 100 mM
- EDTA 50 mM

F) TAE (Tris – Acetato – EDTA)

- Para preparar solución *stock/L* (50X)
- 242 g Tris – base
- 57.1 mL de ácido acético glacial
- 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0
- NOTA: Solución de trabajo (1X)

G) Marcador de peso molecular

Uso: Electroforesis en gel

Conservación: -20°C en tubos para microcentrífuga bien cerrados y etiquetados.

- Solución stock comercial 1 Kb Ladder (Invitrogen)
- Agua desionizada estéril o agua inyectable
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL nuevos y esterilizados
- Puntas amarillas (1-200 μ L) para micropipeta nuevas y esterilizadas
- Micropipeta de 2 a 20 μ L
- Micropipeta de 20 a 200 μ L

Preparación:

- Tomar 5 μ L del Stock comercial y colocarlos en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL previamente etiquetado.
- Tomar 45 μ L de agua desionizada estéril y agregarlos al tubo.
- Homogenizar en agitador tipo Vórtex.
- Almacenar a -20°C hasta su uso.

11.3 *Formato: Carta de consentimiento informado*

ANEXO CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE ESTUDIO: "PREVALENCIA DE BAJA RESPUESTA A CLOPIDOGREL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA"

INTRODUCCIÓN: La siguiente información describe el protocolo al cual se le está invitando a participar de forma activa. El investigador deberá responder cualquier duda que surja a partir de la lectura de ésta.

PROPOSITO DEL ESTUDIO: Evaluar si se está teniendo una buena respuesta al tratamiento con Clopidogrel y Aspirina mediante la actividad plaquetaria.

PROCEDIMIENTO: Ha sido elegido para participar en este estudio, si usted desea participar, contestará preguntas acerca de su estado de salud. De igual forma proporcionará una muestra de sangre para realizar estudios de laboratorio y determinar ciertas proteínas que indicarán el estado de activación de las plaquetas (pequeñas células de la sangre encargadas de la coagulación y formación de trombos). El presente estudio no implica ningún riesgo para su salud.

BENEFICIOS PARA PARTICIPANTES: Los resultados aportarán información nueva e importante acerca del estado actual de la enfermedad y la manera como la población mexicana responde a estos tratamientos. En caso de detectarse cualquier alteración importante, usted será canalizado con el personal capacitado para su atención.

CONFIDENCIALIDAD. La información obtenida durante el desarrollo de este estudio es absolutamente confidencial y no puede ser utilizada con otro fin. Usted será informado acerca de cualquier hallazgo de importancia para su salud durante el desarrollo de este estudio.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA: Es de mi conocimiento que será libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. Además sé que puedo pedir información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio. Recibiré, si así lo solicito una copia de los resultados de laboratorio de los estudios que se me practiquen. Debo informar, tan pronto como sea posible a los investigadores de cualquier cambio importante que ocurra en mi salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (p. ej. tabaquismo, alcoholismo) o cambio de domicilio. Sé que las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio. Los costos del estudio los cubrirán los fondos del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular y el paciente no pagará por los estudios paracéntricos propios del proyecto de investigación.

He comprendido el contenido de esta carta de consentimiento informado, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente acepto participar en este estudio.

Fecha _____

Paciente (Nombre y Firma)

Testigo (Nombre y Firma)

11.4 *Aprobación de protocolo. Comité de ética. Hospital General “Dr. Miguel Silva”*



“MICHOCAN TRABAJA”

| |
|---|
| DEPENDENCIA: HOSPITAL GENERAL DR. MIGUEL SILVA |
| DEPARTAMENTO: ENSEÑANZA E ENSEÑANZA |
| NÚMERO DE OFICIO: 5009/083/09 |
| EXPEDIENTE: |

ASUNTO: Aprobación de protocolo

Morelia, Michoacán, 26 de enero del 2010.

Dra. Martha Eva Viveros Sandoval
Investigadora Principal
Presente

Por este conducto informo a usted que el Comité de Ética del Hospital General Dr. Miguel Silva, reviso y aprobó el protocolo de investigación titulado:

- Estudio de la Fosfoproteína estimulada por Vasodilatadores (VASP) para evaluación de reactividad plaquetaria y resistencia a clopidogrel.

Con la colaboración del Dr. Carlos Arturo Areán Martínez, adscrito al Hospital General “Dr. Miguel Silva”

Sin otro particular, le envié un cordial saludo.

ATENTAMENTE


DR. GUILLERMO BUNZO BRAVO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA



GPB*CCAM*sev