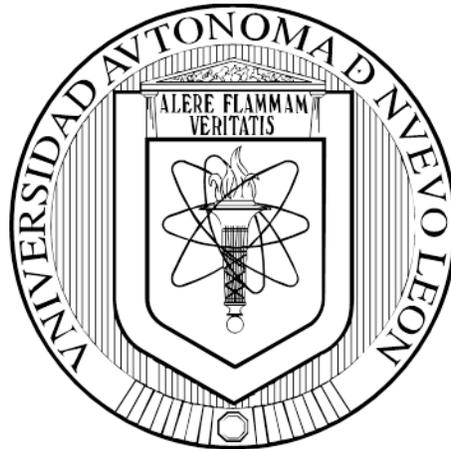


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA AL CLOPIDOGREL Y SU
ASOCIACIÓN CON EL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA CYP2C19*2
EN PACIENTES CON ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR DEL
NORESTE DE MÉXICO**

POR

FÉLIX RAMÓN CEDILLO SALAZAR

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN MEDICINA**

JUNIO, 2019

**“PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA AL CLOPIDOGREL Y SU
ASOCIACIÓN CON EL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA CYP2C19*2 EN
PACIENTES CON ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR DEL NORESTE DE
MÉXICO”**

Aprobación de la Tesis:

Dr. med. Francisco Javier Bosques Padilla

Director de Tesis

Dra. med. Laura Elía Martínez de Villarreal

Miembro

Dr. med. José Carlos Jaime Pérez

Miembro

Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez

Miembro

Dr. en. C. Ricardo Cerda Flores

Miembro

Dra. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Instituto para las Arritmias Cardiacas y Diagnóstico Cardiovascular, en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, así como en el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. med. Francisco Javier Bosques Padilla, la co-dirección de la Dra. med. Laura Elía Martínez de Villarreal y como miembro de la comisión el Dr. med. José Carlos Jaime Pérez y el Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez.

Vo.Bo.

Dr. med. Francisco Javier Bosques Padilla
Director de Tesis

DEDICATORIA

“Con gran cariño y admiración, para mis padres Guadalupe Evaristo y María Teresa. A mis hijas María Antonieta y Montserrat por ser mi motivación y conciencia. Y para ti, Claudia Ivette, por la fortuna de coincidir en esta vida y demostrarme con tu ejemplo y compasión, que todo es alcanzable”

AGRADECIMIENTOS

No tengo la más mínima duda, de que, a lo largo de mi existencia, he sido inmensamente afortunado, no sólo por haberme desarrollado en el seno de una familia conformada por unos padres ejemplares, por ser amorosos, respetuosos, promotores del libre pensamiento, la ciencia, la tecnología, la espiritualidad y el deporte, sino también por contar con un hermano mayor de intelecto sobresaliente, retador, inquieto, protector y con una interminable búsqueda de la verdad científicamente fundamentada, que, como fiel reflejo de mi padre, adquirió desde nuestra infancia. Esto, acompañado de mis dos hermanas menores, Ileana y Mayte, cuyo talento equiparable al de mi hermano Evaristo, incluye la ternura, compasión, sentido de protección familiar y gran calidad humana que mi madre les inculcó a imagen y semejanza, desde sus primeros años de vida. Con esos firmes cimientos establecidos por mi madre, María Teresa Salazar Escamilla y de mi padre, Guadalupe Evaristo Cedillo Garza, crecí y me desarrollé en una familia de trabajo, esfuerzo, unidad, corresponsabilidad y dedicación al estudio y deporte. Esos fundamentos me han marcado de por vida.

He sido bendecido con la oportunidad de tener excelentes profesores desde mi formación básica y media superior. Profesores y profesoras de gran capacidad profesional y calidad humana, han ayudado a forjar mi carrera, que en la fase de la licenciatura y el posgrado, estuvieron decididamente marcadas por la influencia de verdaderos ejemplos como mi padre, el Ing. Guadalupe Evaristo Cedillo Garza, los doctores Ricardo Valero, David Gómez Almaguer, Jesús Zacarias Villarreal Pérez, Jorge Horacio Bahena Cuevas, Antonio Pacifico, Nadim Nassir,

Angélica Romero, Santos Guzmán López y Edelmiro Pérez Rodríguez, por sólo mencionar algunos; vaya que cada uno de ellos, en diferentes circunstancias y por distintos motivos, dejaron profunda huella en mi desarrollo profesional.

Hoy, que alcanzamos una nueva meta (así, en plural, porque el trabajo en equipo es el que refleja este grado académico que pronto recibiré) no es más que la consecuencia natural del trabajo y constante búsqueda de la verdad, que constituyen el fundamento filosófico de mi querida alma mater, la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Especial agradecimiento merece mi compañera de vida, Claudia Ivette Ancer Arellano, por su incondicional y permanente apoyo, que siempre me permitió perseverar hasta alcanzar esta y otras metas de vida.

A mis hijas, les agradezco por su apoyo, su comprensión y por acompañarme a realizar este proyecto científico del cual son parte y por permitirme utilizar parte del tiempo familiar, para cumplir este sueño.

Gracias a todos quienes formaron parte de este proyecto y en lo particular, a todos los miembros de mi Comité Doctoral, cuya orientación, soporte y guía, me llevaron a buen puerto.

CONTENIDO

Capítulo I	1
RESUMEN.....	1
Capítulo II	3
INTRODUCCIÓN.....	3
Enfermedad cardiovascular	3
Aterotrombosis	4
Etiopatogenia de la aterotrombosis	4
Plaquetas.....	6
Activación plaquetaria.....	7
Adhesión plaquetaria	8
Agregación y secreción plaquetaria.....	8
Tratamiento antiagregante plaquetario	8
Clopidogrel	11
Citocromo P450	12
Polimorfismos en CYP2C19 y resistencia a clopidogrel	13
Fenotipo metabolizador y CYP2C19*2	14
Determinación de la reactividad plaquetaria.....	15
Capítulo III	18
HIPÓTESIS	18
Capítulo IV	19
OBJETIVOS	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Capítulo V	20
MATERIAL Y MÉTODOS	20
Diseño del estudio.....	20
Población de estudio	20
Criterio de inclusión	20
Criterio de exclusión	21
Criterio de eliminación	21

Tamaño de muestra	21
Estrategia General	22
MATERIALES	23
Consumibles.....	23
Reactivos.....	23
Material Biológico	24
Equipo	24
Programas computacionales	25
MÉTODOS	26
Lugar donde se realizó el estudio.....	26
Extracción de ADN	26
Evaluación de la cantidad y calidad del ADN	27
Análisis de polimorfismos	28
Genotipificación	28
Análisis de discriminación alélica	30
Manejo y resguardo del material genético y del mecanismo de codificación para proteger la confidencialidad de la información genética.	30
Reactividad plaquetaria	31
Capítulo VI	32
RESULTADOS	32
Análisis demográfico.....	32
Determinación de la antiagregación plaquetaria.....	35
Determinación del polimorfismo	37
Análisis de la frecuencia genotípica	38
Fenotipo metabolizador	39
Asociación genotipo-fenotipo.....	39
Análisis de asociación entre las características de la población y PRU	41
Capítulo VII	42
DISCUSIÓN.....	42
Capítulo VIII	46
CONCLUSIÓN.....	46
Capítulo IX	47
ANEXOS.....	47

Consentimiento informado.....	47
Extracción de ADN con kit wizard genomic DNA purification	48
Electroforesis en gel de agarosa- verificación de la integridad del ADN	50
Artículo original aceptado	51
Capítulo X	59
BIBLIOGRAFÍA.....	59
Capítulo XI	62
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales antiagregantes plaquetarios.	10
Figura 2. Sitios de acción de los antiagregantes plaquetarios (Tomado de referencia 11).....	10
Figura 3. Fenotipo metabolizador y CYP2C19*2.	15
Figura 4. Principales fármacos utilizados por los pacientes.....	35
Figura 5. PRU y porcentaje de antiagregación plaquetaria.....	37
Figura 6. Análisis de discriminación alélica.....	38
Figura 7. Niveles de PRU en portadores y no portadores del polimorfismo CYP2C19*2.....	40
Figura 8. Fenotipo metabolizador y Genotipo.	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación del master mix para PCR tiempo Real.....	29
Tabla 2. Programa: CYP2C19TAQMAN	29
Tabla 3. Características de la población	33
Tabla 4. Principales comorbilidades.	34
Tabla 5. Determinación de la antiagregación plaquetaria en VerifyNow	36
Tabla 6. Frecuencia genotípica.....	38
Tabla 7. Asociación genotipo- fenotipo	39
Tabla 8. Asociación genotipo-fenotipo metabolizador (PRU).....	40
Tabla 9. Asociación entre características de la población y niveles de PRU. ...	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ACV: Accidente cerebrovascular

AAS: Ácido acetilsalicílico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AIT: Ataque isquémico transitorio

AT: Aterotrombosis

CLO: Clopidogrel

COX-1: Ciclooxygenasa 1

CYP2C19*2: Citocromo P 2C19 variante 2

EAC: Enfermedad arterial coronaria

EAP: Enfermedad arterial periférica

ECV: Enfermedad cardiovascular

FvW: Factor de von Willebrand

PRU: Unidades de reacción P2Y12

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

TXA2: Tromboxano A 2

Capítulo I

RESUMEN

Dr. Félix Ramón Cedillo Salazar

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación:

Área de estudio: Farmacogenética

Candidato para obtener el grado de Doctor en Medicina

Número de páginas: 64

Título del estudio: “Prevalencia de la resistencia al clopidogrel y su asociación con el polimorfismo genético de la *CYP2C19*2* en pacientes con alto riesgo cardiovascular del noreste de México”

Introducción: Los antiplaquetarios orales son clave en la farmacoterapia moderna de las enfermedades aterotrombóticas cardiovasculares. Clopidogrel (CLO) constituye el principal tratamiento preventivo de aterotrombosis (AT). Sin embargo, se ha documentado una considerable variación interindividual en la respuesta a CLO, lo que da como resultado una terapia subóptima y mayor riesgo de efectos adversos en algunos pacientes. La enzima CYP2C19 es la isoforma CYP que activa CLO a su metabolito activo. Se han identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

en el gen CYP2C19 como fuertes predictores de respuesta farmacológica alterada a CLO. Al menos 16 variantes se han asociado con cambios en la actividad de CYP2C19.

Objetivo: Determinar la prevalencia de la resistencia al efecto antiagregante plaquetario del clopidogrel, y su relación con la presencia del polimorfismo genético CYP2C19*2, en una población de pacientes mexicanos de alto riesgo cardiovascular del noreste del país.

Método: Se reclutaron un total de 102 sujetos con alto riesgo cardiovascular del noreste de México, con dosis de mantenimiento de 75 mg de CLO/día. La reactividad plaquetaria se midió con el ensayo VerifyNowP2Y12, la presencia de CYP2C19*2 se identificó mediante PCR en tiempo real.

Resultado: Los pacientes fueron clasificados por el estado metabolizador CYP2C19*2 utilizando nomenclatura consenso, como metabolizador normal (G/G), metabolizador intermedio (G/A) y metabolizador pobre (A/A), respectivamente. La frecuencia del fenotipo para CYP2C19*2 fue 74.5% (G/G), 21.6% (G/A) y 3.9% (A/A). Los sujetos con alelo A presentaron ≥ 235 niveles PRU, clasificándolos como metabolizadores deficientes. La prevalencia de eficacia reducida a CLO se asoció con la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 en pacientes mexicanos.

Conclusiones: La presencia del alelo CYP2C19*2 se relaciona con resistencia al efecto antiagregante plaquetario del clopidogrel ($p = 0,003$).

Dr. med. Francisco Javier Bosques Padilla

Director de Tesis

Capítulo II

INTRODUCCIÓN

Enfermedad cardiovascular

Enfermedad cardiovascular (ECV) es un término general utilizado para una serie de patologías relacionadas, comúnmente definidas como enfermedad coronaria (cardiopatía coronaria), enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca reumática y congénita y tromboembolismo venoso¹. Anualmente 17.9 millones de personas mueren por enfermedades cardiovasculares y a nivel mundial representan el 31% de la mortalidad, la mayoría en forma de enfermedad coronaria y accidente cerebrovascular².

Se estima que en México las ECV representan el 20% del total de muertes en los adultos. De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en 2016 se reportaron 136,342 fallecimientos a causa de enfermedades del corazón, mostrando un aumento de 7,611 muertes respecto al 2015. Las principales causas de muerte incluyen enfermedad isquémica del corazón, enfermedades cerebrovasculares, hipertensivas, entre otras³.

La enfermedad cardiovascular de origen isquémico es la principal causa de muerte en el mundo. Las principales presentaciones clínicas son:

- Accidentes cerebrovasculares
- Enfermedad arterial vascular periférica
- Cardiopatía isquémica

Para que estos eventos vasculares ocurran la aterotrombosis es un sustrato fundamental.

Aterotrombosis

Se define aterotrombosis como la ruptura de la placa aterosclerótica con trombosis superpuesta, es la principal causa de mortalidad en el mundo occidental. La aterosclerosis es un proceso difuso de inicio temprano en la infancia y progresa asintóticamente a través de la vida adulta. Más adelante en la vida, se manifiesta clínicamente como enfermedad arterial coronaria (EAC), accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio (AIT) y enfermedad arterial periférica (EAP). Desde el punto de vista clínico, deberíamos visualizar esta enfermedad como una entidad patológica única que afecta a diferentes territorios vasculares⁴.

Etiopatogenia de la aterotrombosis

Para que el proceso de activación de las plaquetas ocurra durante la aterotrombosis, son indispensables una serie de condiciones⁵:

1. Que exista disfunción endotelial.
2. Alteraciones en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas.

3. Inflamación crónica en la que estén implicadas citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento.
4. Estrés oxidativo
5. Un estado hipercoagulante.

La aterotrombosis inicia con la presencia de una placa aterosclerótica. Los fibroateromas, ateromas o placas ateroscleróticas, son protuberancias asimétricas focales del estrato o capa más interna del vaso, la íntima. Estas placas están formadas por una matriz de tejido conjuntivo, detritos, endotelio y células musculares lisas⁶.

El proceso aterosclerótico inicia con la entrada de lipoproteínas a través del endotelio vascular. Posteriormente, la activación del endotelio facilita la penetración y el acumulo de monocitos que se diferencian a macrófagos y fagocitan las lipoproteínas modificadas, con formación de células espumosas⁷.

El proceso de agregación plaquetaria como consecuencia de lesión vascular inicia con la ruptura de la capa fibrosa que recubre a la placa aterosclerótica. El resultado, es la formación de un trombo o coágulo, dando lugar a lo que se conoce como aterotrombosis. Por lo tanto, la aterotrombosis es primordial en la patogénesis de la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares y la enfermedad arterial vascular periférica, que ocurren espontáneamente en los pacientes^{4,7}.

En resumen, la cascada de procesos que se desencadenan por una lesión vascular y que dan lugar a la formación del trombo intra-arterial que produce

la isquemia, se fundamenta en la adhesión, activación y agregación de las plaquetas.

Cuando la capa íntima de un vaso sanguíneo se interrumpe, como ocurre después de la ruptura de una placa de ateroma, el colágeno subendotelial y el factor de von Willebrand (FvW) son expuestos a la sangre circulante.

Plaquetas

Las plaquetas son células enucleadas de 1-2 μm de tamaño, producidas en la médula ósea por fragmentación de los bordes de los megacariocitos, que se acumulan en el lugar donde el endotelio está disfuncional o dañado dentro de la pared arterial, lo cual inicia la formación del trombo. Los valores normales de las plaquetas es de $150-400 \times 10^9/\text{l}$. Diariamente, un adulto sano produce en promedio alrededor de 1×10^{11} plaquetas. La expectativa de vida de las plaquetas es de 7 a 10 días. En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma inactiva y expresan en su superficie un pequeño número de moléculas que, en estado activado, facilitan su interacción con otras plaquetas y otras células de su entorno⁵.

Los principales organelos contenidos en las plaquetas son las mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, gránulos (cuerpos) alfa y gránulos densos. Tanto los gránulos alfa como los gránulos densos son sumamente importantes debido a que contienen una gran cantidad de factores que influyen en la coagulación. Los gránulos alfa contienen selectina P, factor V, factor VIII, FvW, trombospondina, fibronectina, fibrinógeno, β -tromboglobulina, factor plaquetario 4 y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés). Los gránulos densos almacenan adenosín difosfato (ADP),

calcio y serotonina, y a su vez, el citoplasma puede contener otras sustancias, como: serotonina, epinefrina, norepinefrina, óxido nítrico y citocinas^{8,9}.

La trombopoyetina es la hormona que permite el adecuado desarrollo de las plaquetas, la cual se sintetiza en el músculo liso y médula ósea, y no exclusivamente en el riñón o en el hígado. La trombopoyetina es eliminada a través de las mismas plaquetas que forma, por lo tanto, a mayor destrucción plaquetaria, mayor concentración de trombopoyetina circulante⁹.

Las plaquetas participan en la hemostasia y la trombosis, esto lo consiguen adhiriéndose al endotelio vascular dañado⁹.

Activación plaquetaria

La activación de las plaquetas desempeña un papel fundamental en las respuestas tanto benignas como patológicas a lesiones vasculares y formación de trombos¹⁰. El mecanismo de formación del trombo plaquetario puede dividirse en cuatro etapas⁵:

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

Adhesión plaquetaria

La fijación del FvW a su receptor en la membrana plaquetaria (Gp Ib) dirige la adhesión plaquetaria. Las plaquetas se anclan también a la pared del vaso dañado mediante la unión a los receptores del colágeno subendotelial. En particular, la interacción inicial entre colágeno y GPVI induce un cambio conformacional (activación) en las integrinas de las plaquetas GPIIb/IIIa y GPIa/IIa. El FvW y el colágeno forman sólidas uniones con GPIIb/IIIa y GPIa/IIa respectivamente, anclando a las plaquetas en su lugar^{5,10}.

Agregación y secreción plaquetaria

Posterior a la deposición de las plaquetas sobre el FvW y el colágeno, se requiere el reclutamiento de nuevas plaquetas desde la circulación, en un proceso conocido como agregación plaquetaria. En respuesta a los estímulos anteriormente mencionados, las plaquetas se activan, estimulándose la producción de tromboxano A₂ (TXA₂) (mediante las enzimas ciclooxigenasa-1 (COX-1) y tromboxano sintetasa) y el adenosín difosfato (ADP). Estos mediadores se liberan y se fijan a sus receptores plaquetarios respectivos, amplificando así el proceso de activación⁵.

Tratamiento antiagregante plaquetario

Los antiagregantes en uso han ampliamente utilizados sido en la prevención de eventos cardiovasculares primarios en la población de alto riesgo y eventos secundarios en individuos que ya han presentado uno o más eventos cardiovasculares trombóticos. Se alcanza un balance favorable

entre los beneficios y las complicaciones de la terapia antiplaquetaria al tratar pacientes en los cuales el riesgo trombótico supera los riesgos de complicaciones hemorrágicas¹¹.

Los principales fármacos antiplaquetarios pueden ser clasificados en dos grupos según su mecanismo de acción¹¹:

- 1) Inhibidores de enzimas plaquetarias: AAS y Dipyridamol
- 2) Inhibidores de receptores plaquetarios: Clopidogrel, Ticlopidina, Antagonistas de GPIIb-IIIa.

La inhibición de la agregación plaquetaria con fármacos como el clopidogrel y el ácido acetilsalicílico, constituyen la piedra angular del tratamiento preventivo de la aterotrombosis.

La mayoría de los autores considera al ácido acetilsalicílico (AAS) como el antiagregante de referencia y se recomienda en un amplio espectro de pacientes con riesgo cardiovascular de moderado a alto. Sin embargo, el tratamiento con AAS presenta limitaciones, un ejemplo es que inhibe la síntesis de tromboxano A₂, un potente mediador de la activación de las plaquetas, pero no actúa sobre otros mediadores de la agregación, como la adenosina difosfato (ADP), la trombina o la fosfodiesterasa¹². Una gran cantidad de pacientes siguen presentando fenómenos trombóticos, a pesar del tratamiento con AAS u otros antiagregantes, como el clopidogrel (figura 1)^{12,13}.

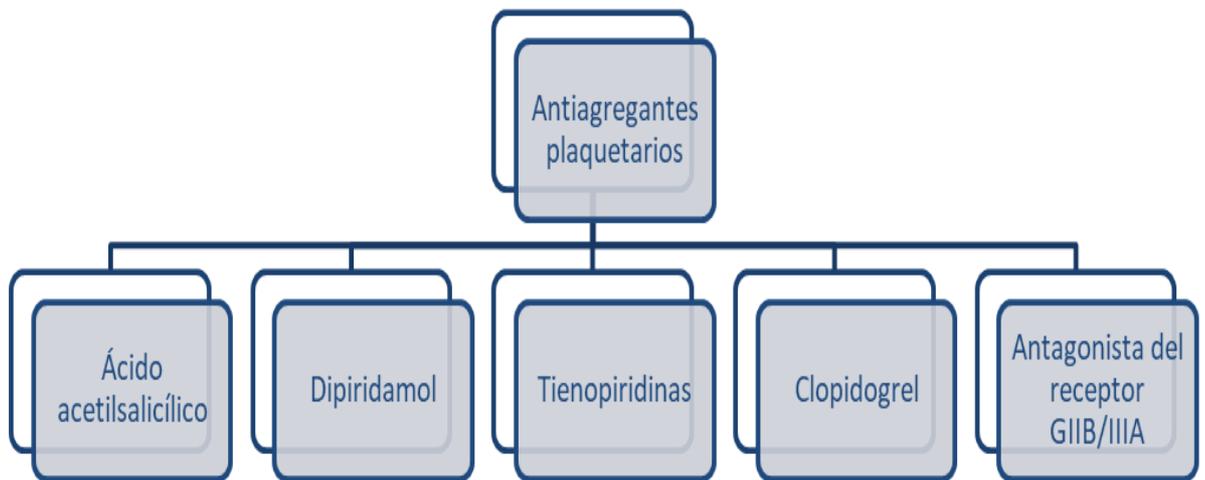


Figura 1. Principales antiagregantes plaquetarios.

Los antiagregantes plaquetarios presentan diferentes mecanismos de acción.

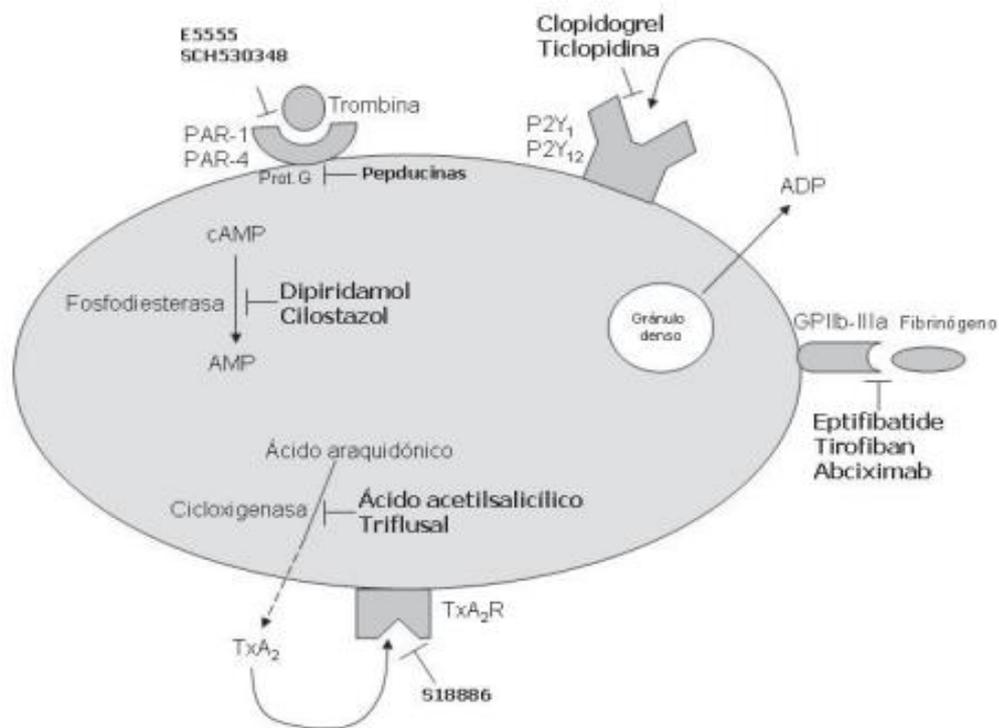


Figura 2. Sitios de acción de los antiagregantes plaquetarios (Tomado de referencia 11).

Sin embargo, más del 20% de la población que los consume, vuelve a presentar eventos aterotrombóticos. Se ha identificado que aproximadamente del 4% al 64% de los pacientes no responden al tratamiento antiagregante plaquetario con clopidogrel y/o al ácido acetilsalicílico. A esta falta de respuesta al efecto antiagregante plaquetario, se le llama resistencia. Entre los diversos factores que contribuyen a la resistencia a terapia antiagregante plaquetaria se encuentran:

- Factores Genéticos
- Factores Celulares
- Factores Clínicos

Clopidogrel

Clopidogrel es un agente antiplaquetario que reduce el riesgo de infarto de miocardio (IM) y accidente cerebrovascular en pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) y en pacientes con enfermedad vascular aterosclerótica. Este fármaco, también está indicado en combinación con AAS en pacientes sometidos a intervenciones coronarias percutáneas (ejemplo: la colocación de un stent)¹⁴.

Clopidogrel tiene características farmacodinámicas muy especiales y complejas, entre las que se incluyen las siguientes: metabolismo hepático de primer paso, variación en la absorción, metabolismo de fármacos y SNPs en las enzimas responsables de su metabolismo^{11,13}. La eficacia de clopidogrel depende de su conversión a un metabolito activo por la enzima CYP2C19.

Citocromo P450

Las enzimas citocromos P450 (P450) o CYPs son responsables del metabolismo de la mayoría de los fármacos más frecuentemente prescritos. Estas enzimas catalizan reacciones de fase I de biotransformación de xenobióticos, generalmente introduciendo o exponiendo un grupo funcional hidrofílico en el fármaco. Además, desempeñan un papel importante en la síntesis de hormonas esteroideas, colesterol, ácidos grasos y biliares¹⁵.

En humanos se han identificado aproximadamente 57 genes CYP, siendo los más importantes para el metabolismo de los fármacos: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4^{15,16}.

La presencia de polimorfismos en los genes del citocromo P450 pueden afectar la función de estas enzimas. El metabolismo de distintos fármacos puede verse afectado cuando un paciente presenta los polimorfismos, por lo tanto, el paciente puede metabolizarlos de forma lenta o muy rápida.

Polimorfismo

Polimorfismo significa literalmente «muchas formas». Por lo tanto, los polimorfismos genéticos, cromosómicos o de secuencia del ADN son los responsables de la gran variabilidad existente entre individuos de una misma especie¹⁷. Los polimorfismos son las variantes del genoma que aparecen debido a cambios en el genoma en ciertos individuos, son hereditarios y se hacen más frecuentes en la población conforme pasan las generaciones. Se considera que los polimorfismos son la base de la evolución debido a que pueden contribuir al ser silentes o de manera positiva al proporcionar ventajas

para los individuos, o incluso actuar de manera negativa al fomentar el desarrollo de distintas enfermedades¹⁸.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

Como lo sugiere el acrónimo, un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) el marcador es solo un cambio de una sola base en una secuencia de ADN, con una alternativa habitual de dos posibles nucleótidos en una posición dada. Para que una posición de base con alternativas de secuencia en el ADN genómico se considere como un SNP, se considera que el alelo menos frecuente debe tener una frecuencia del 1% o mayor. Aunque en principio, en cada posición de un tramo de secuencia, cualquiera de las cuatro bases de nucleótidos posibles puede estar presente, los SNP suelen ser bialélicos en la práctica. Entonces, la diferencia que hay entre una mutación y un polimorfismo es que la mutación ocurre en menos del 1% de la población, mientras que el polimorfismo, siendo más común, se le denomina de tal manera cuando el cambio ocurre en más del 1% de la población¹⁹.

Polimorfismos en CYP2C19 y resistencia a clopidogrel

El clopidogrel es un inhibidor de P2RY12 (receptor purinérgico P2Y, proteína G acoplada 12), el cual actúa uniéndose de forma irreversible al receptor P2RY12 de las plaquetas y bloquea la activación y agregación de las plaquetas mediadas por el difosfato de adenosina (ADP). En una gran cantidad de casos en los que se presenta una respuesta pobre o deficiente

al clopidogrel se debe a las variaciones genéticas en el gen CYP2C19. Sin embargo, existen otros genes que pueden influir en la respuesta de clopidogrel como ABCB1 , P2Y12 y GPIIIA ¹⁴. El clopidogrel es un profármaco y la enzima CYP2C19 es la principal involucrada en la conversión de clopidogrel en su metabolito activo.

El gen CYP2C19 es altamente polimórfico y puede causar variabilidad en la respuesta a los fármacos que metaboliza. Se han identificado 19 tipos diferentes de variantes, y siete de estas variantes codifican una enzima inactiva, las variantes incluidas son: CYP2C19 * 2, * 3, * 4, * 5, * 6, * 7 y * 8 ²⁰. Los alelos defectuosos que se encuentran con mayor frecuencia en las poblaciones humanas son CYP2C19 * 2 (rs4244285), y existen en dos tipos de variaciones diferentes, CYP2C19 * 2A y CYP2C19 * 2B. El polimorfismo CYP2C19 * 2 es un alelo defectuoso que elimina la actividad catalítica en todos los sustratos, que conlleva una sustitución de una sola base 681G <A en el exón 5, lo cual produce un cambio de sitio de empalme alternativo, lo que reduce drásticamente el metabolismo de los medicamentos²¹. El segundo alelo de pérdida de función importante es CYP2C19 * 3 (rs4986893), que presenta una sustitución de una adenina por una guanina en la base 636 (636G> A) del exón 4, creando un codón de parada prematuro.

Fenotipo metabolizador y CYP2C19*2

De acuerdo al genotipo los pacientes pueden clasificarse como metabolizadores normales, intermedios o pobres, dependiendo de la presencia o ausencia del polimorfismo²²(figura 3).

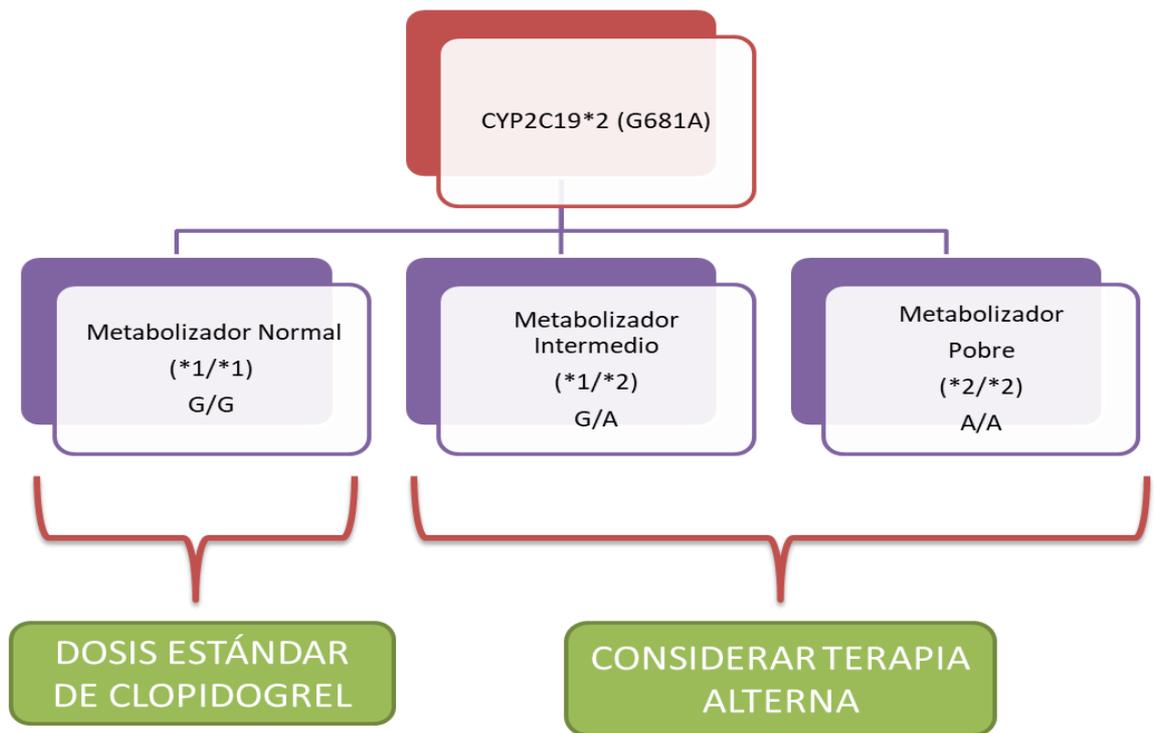


Figura 3. Fenotipo metabolizador y CYP2C19*2.

Determinación de la reactividad plaquetaria

El histórico "patrón de oro" de la agregometría plaquetaria es el método turbidimétrico. El método se basa en la detección de la diferencia en la transmisión de luz por un fotómetro después de agregar un agonista de plaquetas al plasma rico en plaquetas²³.

Las pruebas de función plaquetaria miden la actividad de las plaquetas. La mayoría de los estudios publicados han sido realizados con agregometría

óptica, un método demasiado laborioso para la práctica clínica habitual. Sin embargo, los analizadores rápidos de función plaquetaria disponibles «a pie de cama», como el sistema VerifyNow® (Accumetrics Inc., San Diego, California) hacen más aplicable este análisis en la práctica clínica²⁴.

El sistema VerifyNow detecta la actividad plaquetaria al medir la agregación plaquetaria in vitro en una muestra de sangre expuesta a agonistas específicos. Los resultados del estudio son reportados en Unidades de Reacción P2Y12 (PRU), las cuales indican la cantidad de agregación plaquetaria mediada por ADP, específica para el receptor plaquetario P2Y12 y es usada para medir los efectos de las drogas antiplaquetarias específicas para este receptor, tales como el clopidogrel. El rango de referencia para los individuos que no reciben inhibidores del receptor P2Y12, es de 194-418 PRU. Los niveles PRU menores a 194, son evidencia específica del efecto antiagregante plaquetario del bloqueo del receptor P2Y12. Diversos autores, sugieren que un nivel PRU de menos de 208, se considera como una respuesta buena o apropiada a la terapia antiagregante plaquetaria para pacientes con padecimientos cardiológicos. Los valores PRU ≥ 235 , han sido correlacionados con una inhibición plaquetaria de aproximadamente el 20% o menos, debido a inhibición del receptor P2Y12.

El monitoreo de las terapias antiplaquetarias mediante el uso de agregometría de transmisión de luz (LTA siglas en inglés) demostró ser predictiva con respecto a los eventos cardiovasculares adversos mayores en pacientes con alto riesgo cardiovascular. Sin embargo, varios estudios anteriores han encontrado una falta de reproducibilidad de la evaluación de la capacidad de respuesta de la aspirina por parte de LTA. Como ejemplo, un estudio de 207

pacientes tratados con aspirina encontró una muy buena reproducibilidad intraindividual de la reactividad plaquetaria, mientras que la reproducibilidad a largo plazo fue pobre²³.

Capítulo III

HIPÓTESIS

Hipótesis Alternativa 1:

El polimorfismo genético CYP2C19*2 influye en forma significativa en el efecto antiagregante plaquetario del clopidogrel.

Hipótesis Nula 1:

El polimorfismo genético del sistema CYP2C19*2 no influye en forma significativa en el efecto antiagregante plaquetario del clopidogrel.

Capítulo IV

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la prevalencia de la resistencia al efecto antiagregante plaquetario del clopidogrel, y su relación con la presencia del polimorfismo genético CYP2C19*2, en una población de pacientes mexicanos de alto riesgo cardiovascular del noreste de nuestro país.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la antiagregación plaquetaria al clopidogrel, alcanzada después de una dosis de mantenimiento de al menos 75 mg/día durante un periodo no menor de 9 días.
- 2) Analizar el polimorfismo genético CYP2C19*2 en pacientes con alto riesgo cardiovascular del noreste de México y compararla con la reportada en otras poblaciones.
- 3) Determinar la prevalencia de la resistencia al efecto antiagregante plaquetario en pacientes con el polimorfismo CYP2C19*2.

Capítulo V

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Observacional, transversal y experimental

Población de estudio

Mayores de 18 años que acudieron al servicio de cardiología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL o al “Instituto para las Arritmias Cardiacas y Diagnóstico Cardiovascular, S. C.” de Monterrey, N. L., que tengan indicación de tratamiento antiagregante plaquetario con clopidogrel en el periodo de Enero-Agosto 2015.

Criterio de inclusión

- Hombres y mujeres mayores de 18 años.
- Alto riesgo de presentar cardiopatía isquémica, arritmias (como fibrilación auricular) o haber presentado un accidente cerebrovascular o ser considerado de alto riesgo cardiovascular por otro padecimiento.
- Haber estado recibiendo tratamiento con clopidogrel a dosis de mantenimiento de al menos 75 mg/día por vía oral, durante los últimos 9 días consecutivos previos a su inclusión en el estudio.

- Voluntarios, con plenas facultades mentales, que firmen el consentimiento informado.

Criterio de exclusión

- Mujeres embarazadas
- Personas que estén tomando prasugrel o ticlopidina.
- Personas que estén tomando inhibidores de la bomba de protones, o bien que hayan suspendido el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones de 1 a 7 días previos al inicio del tratamiento con clopidogrel.
- Antecedentes de alergia al clopidogrel.

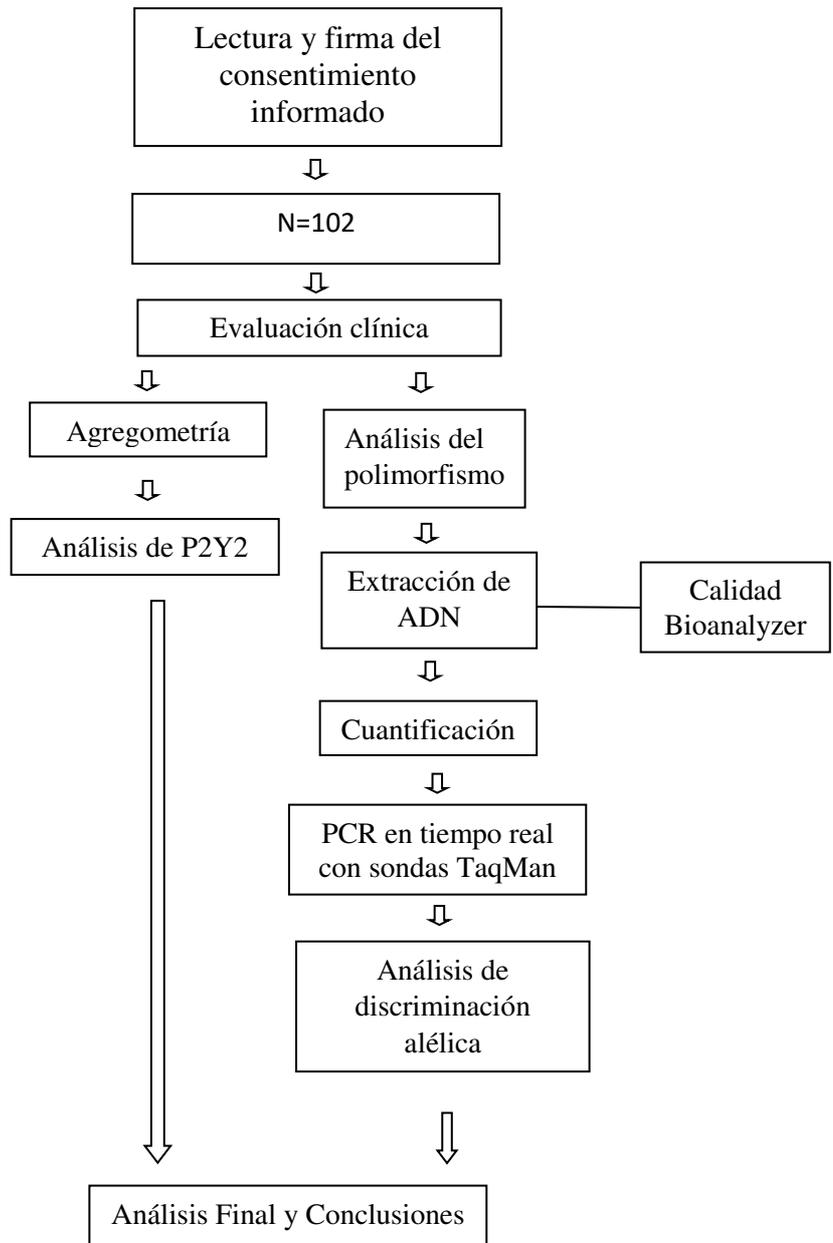
Criterio de eliminación

- Expediente incompleto.
- No cumplimiento de los procedimientos del estudio.
- Reacciones adversas.

Tamaño de muestra

Se utilizó el paquete MINITAB para el cálculo de la muestra (N= 100).

Estrategia General



MATERIALES

Consumibles

- Microtubos Eppendorf de 0.2, 0.7, 1.5 y 2 mL.
- Tubos Qubit para cuantificación.
- Tubos DNA LoBind de 1.5-mL (Eppendorf).
- Placas de 96 pozos (AXYGEN).
- Placas de 96 pozos para PCR tiempo REAL.
- Films para cubrir las placas de 96 pozos (AXYGEN).
- Puntillas de pipeta de barrera de aerosol, libres de nucleasas, estériles.

Reactivos

Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

- DNeasy Blood and Tissue kit de QIAGEN.
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).
- Kit QuantiTMM PicoGreen Assay (Invitrogen).
- Qubit BR dsDNA Assay Kit (Life Technologies).
- Nuclease-free Water (not DEPC-treated) Ambion.

Electroforesis

- Agarosa grado Biología Molecular marca BioRad
- Marcador de peso molecular EZ load(50µg/ml) marca BioRad
- Buffer de carga GelPilot 5X de QIAGEN
- DNA 1000 Kit (Agilent).

- Buffer 1X TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) Life Technologies.

PCR-Tiempo Real

- Taqman Universal pcr master mix, 2x5ml (Applied Biosystems).
- (1)Taqman assay 250 rxn (Applied Biosystems).
- Taqman fast advanced master mix (Applied Biosystems).

Material Biológico

Se utilizaron 102 muestras de sangre en tubos con EDTA como anticoagulante.

Equipo

1. Micropipetas Eppendorf.
2. Micropipetas multicanal Eppendorf.
3. Cámara de electroforesis marca BIO-RAD.
4. Fotodocumentador GelDoc XR BIO-RAD.
5. Espectrofotómetro NanoDrop 8000.
6. Agilent 2100 Bioanalyzer.
7. Separador magnético (Life Technologies).
8. Qubit Fluorometer (Life Technologies).
9. Centrifugas: Centrifuga refrigerada 54178R marca Eppendorf y centrifuga personal 5453 Eppendorf.
10. Concentrador de vacío GeneVac.
11. Termo agitador comfort marca Eppendorf.
12. Step One System (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.)

13. Sistema VerifyNow®.

Programas computacionales

- Microsoft Excel 2016. Licencia UANL.
- Paquete R. Free Software Foundation's GNU General Public License.
- GraphPad 6 Software. GraphPad Software Inc.
- GraphPad 7 Software. GraphPad Software Inc.
- UCSC: Genome Browser. UCSC Genomics Institute.
- Mendeley Desktop versión 1.5.2.
- GeneCards (<http://www.genecards.org>).

MÉTODOS

Lugar donde se realizó el estudio

Este estudio se realizó en el Instituto para las Arritmias Cardiacas y Diagnóstico Cardiovascular, en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, así como en el Servicio de Cardiología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Toma de muestras

Se solicitó a los participantes tener un ayuno mínimo de 4 horas para llevar a cabo la toma de muestra sanguínea. Se extrajeron 9 ml de sangre venosa periférica total mediante vacutainer (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, US) y se depositó en un tubo con EDTA y un tubo rojo. Ambos tubos se identificaron con un folio específico para cada paciente. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Separación de suero y plasma

Después de la extracción de sangre, se permitió que la sangre coagulara durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 a 22° C). Se extrajeron 600 µl del suero que correspondía a la parte superior (líquido amarillo) con una micropipeta, evitando tomar el coágulo y se vació en dos tubos Eppendorf de 1.7 µl (600 µl de suero por cada tubo).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por medio del kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) y Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Para este propósito, las muestras fueron lisadas con buffer de lisis, liberando el contenido citoplasmático y resultando una mezcla compuesta de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Se precipitaron las proteínas y posteriormente se centrifugaron para obtener una capa sólida de proteínas. Se recuperó posteriormente la fase acuosa que contiene el ADN. Finalmente se obtuvo el material genético mediante precipitación con isopropanol. Para eliminar el exceso de sales del ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en la solución de rehidratación de ADN del kit comercial.

Evaluación de la cantidad y calidad del ADN

Electroforesis en gel de Agarosa

Se verificó la calidad de la extracción de ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% con una alícuota de 5 μ L de ADN y 1 μ L de jugo azul. Las muestras se corrieron a 80 Volts durante 60 minutos. Para visualizar el ADN se llevó el gel teñido con GelRed al fotodocumentador Gel Doc 100 de Bio Rad.

Cuantificación de ADN por espectrofotometría

El ADN se cuantificó en el equipo Nanodrop (Thermo Scientific), utilizando una alícuota de 1 μ L de ADN. Se verificó la calidad por medio de la relación 260nm/280nm, 260nm/230nm y la medición a 330nm. Los ácidos nucleicos (ADN y RNA) presentan su pico máximo de absorbancia a λ 260nm y las proteínas lo presentan a λ 280nm. La relación de absorbancias a estas longitudes de onda (260nm/280nm) se ha utilizado como una medida de la pureza tanto de ADN como de proteínas.

Cuantificación de ADN utilizando el kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Invitrogen).

La cuantificación por fluorimetría se llevó a cabo con el reactivo PicoGreen en el equipo QUBIT. Para la cuantificación con PicoGreen primero se construyó una curva de calibración con estándares de concentración conocida a partir del stock que provee el kit. Se preparó una solución de trabajo diluyendo el reactivo Quant-itTTM 1:200 en el buffer Quant-iTTM. 200µl de solución de trabajo por cada muestra y para cada estándar fueron requeridos.

Análisis de polimorfismos

A partir de 20 ng de ADN genómico se realizó la genotipificación del SNP CYP2C19*2 (681G>A, dbSNP rs4244285) con el uso de Sondas Taqman diseñadas por Applied Biosystems. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se utilizó el Sistema de PCR tiempo real Step One (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Genotipificación

Se realizó un ensayo de genotipificación por PCR en tiempo real con sondas Taqman marcadas con VIC/FAM (alelo1/alelo2). El máster mix fue preparado para 105 reacciones (tomando en cuenta exceso) (Tabla 1). En placas de 96 pozos se colocaron 10 µL y 1 µL de muestra, teniendo un volumen final de reacción fue de 11 µL. Las muestras fueron colocadas en la placa con pipeta multicanal en un orden preestablecido en la placa maestra de almacenamiento de ADN a una concentración de 20 ng/µL. En cada placa fueron analizadas

93 muestras y 3 controles negativos. Una vez colocados en la placa el master mix y las muestras se colocó un film a la placa, se llevó a vortex por 10 segundos y posteriormente se centrifugó por 10 segundos (Spin). El equipo utilizado para llevar a cabo el ensayo fue el STEP ONE SYSTEM, bajo el programa CYP2C19TAQMAN.

Reactivo	1X	105X
Master mix 2X	5.5µL	577.5 µL
Sonda 40X	0.275 µL	28.875 µL
Agua grado biología molecular	4.225 µL	443.625 µL
ADN (20ng/ µL)	1 µL	-
Volumen final	11 µL	10 µL

Tabla 1. Preparación del master mix para PCR tiempo Real

El programa utilizado para el análisis del polimorfismo estudiado fue el siguiente:

Programa: CYP2C19TAQMAN	
Paso	Condiciones
Pre-Incubación	95°C por 10 min
Amplificación:	50 ciclos
1. Desnaturalización	95°C por 10 seg
2. Alineamiento	60°C por 01 min
3. Elongación	72°C por 10 seg
Enfriamiento	40°C por 30 seg

Tabla 2. Programa: CYP2C19TAQMAN

Análisis de discriminación alélica

El análisis de discriminación alélica se llevó a cabo en el mismo equipo y posteriormente los resultados fueron analizados en hoja de cálculo de Excel, el programa GraphPad Prism v7.0 y SPSS v20 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de Chi², prueba T-Student y ANOVA de una vía.

Manejo y resguardo del material genético y del mecanismo de codificación para proteger la confidencialidad de la información genética.

A cada paciente se le otorgó una clave de registro única, la cual fue utilizada para la generación de las bases de datos. La clave consistía en 3 números, separados por un guión y la fecha de toma (p.ej. 001-050716). Una vez obtenido el material genético fue almacenado a -20°C rotulado con la clave del participante hasta su uso. Los resultados del análisis genético fueron colocados en la base de datos a la cual solo tenía acceso el investigador principal y los co-investigadores. Los datos genéticos humanos y las muestras biológicas obtenidas con la presente investigación científica no fueron asociados con una persona identificable. Los datos obtenidos no fueron conservados de manera tal que sea posible identificar a la persona a quien corresponda la muestra por más tiempo del necesario para cumplir los fines con los que fueron recolectados o ulteriormente tratados.

Reactividad plaquetaria

Para llevar a cabo la determinación de la antiagregación o reactividad plaquetaria se utilizó el sistema VerifyNow, el cual detecta la actividad plaquetaria al medir la agregación plaquetaria in vitro en una muestra de sangre que es expuesta a agonistas específicos, lo que incluye la inhibición de actividad plaquetaria como respuesta a terapias antiplaquetarias. El sistema VerifyNow® es una prueba con sangre total que se utiliza en el entorno de laboratorio o en el consultorio, y que mide la agregación inducida por plaquetas como un aumento en la transmitancia de luz. El equipo utilizado consiste en un instrumento de detección óptica basada en turbidimetría, cuenta con dispositivos de prueba de un solo uso y controles de calidad.

La recolección de la sangre total de un sitio periférico se llevó a cabo en un tubo de recolección al vacío. El tubo fue mezclado por inversión suavemente cinco veces y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso. Al inicio de la prueba, el dispositivo de prueba se insertó en el instrumento y el tubo de recolección de muestra se invirtió nuevamente con suavidad varias veces y se colocó en el dispositivo de prueba, sin que fuera necesario remover la tapa, preparar la muestra o pipetear. El instrumento extrae automáticamente la muestra del tubo de recolección al vacío hacia el dispositivo de prueba e inicia el análisis de esta. Tanto el dispositivo y los tubos usados se remueven y desechan. No hay necesidad de que el usuario manipule la sangre. Los resultados se mostraron dentro de los 2 a 5 minutos.

Capítulo VI

RESULTADOS

Análisis demográfico

Se reclutaron un total de 106 sujetos con diagnóstico de alto riesgo cardiovascular del noreste de México que asistieron al servicio de cardiología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (UANL) y al “Instituto de Arritmias Cardíacas y Diagnóstico Cardiovascular, S. C. “de Monterrey, México. Los sujetos incluidos en el estudio se reclutaron de enero a agosto de 2015, con una edad media de 68 (35-91) años. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: hombres y mujeres mayores de 18 años, con diagnóstico de alto riesgo cardiovascular, han recibido tratamiento con clopidogrel en una dosis de mantenimiento de al menos 75 mg / día por vía oral durante los últimos 9 días consecutivos antes de la inclusión en el estudio. Todos los participantes firmaron aceptaron participar en el estudio y firmaron voluntariamente el consentimiento informado. Cuatro pacientes fueron eliminados del estudio por no tener la información completa, dejando una muestra de 102 pacientes.

El 62.7% de los participantes fueron hombres, mientras que el 37.3% fueron mujeres. El peso promedio de los pacientes fue de 78.94+/- 17.3 kg, mientras que la talla promedio fue de 1.66 +/- 0.09 m. Con los datos anteriores se obtuvo el índice de masa corporal (IMC) por sexo y rango de edad, de acuerdo al IMC el 29.4% de los participantes presentó obesidad. El 35.3% de los participantes presentó diabetes mellitus. La dislipidemia se observó en el 53.9% y un 57.8% de pacientes con hipertensión arterial. El 32.35% de los pacientes menciona en sus hábitos alcoholismo, mientras que el 28.4% tabaquismo (ver tabla 3).

Características	n (%)
Edad	68 (35 – 91)
> 60 años	76 (25.5)
< 60 años	26 (74.5)
Género	
F	38 (37.3)
M	64 (62.7)
Obesidad (+)	30 (29.4)
Obesidad (-)	72 (70.6)
DM (+)	36 (35.3)
DM (-)	66 (64.7)
Dislipidemia (+)	55 (53.9)
Dislipidemia (-)	47 (46.1)
Tabaquismo (+)	29 (28.4)
Tabaquismo (-)	73 (71.6)
Hipertensión (+)	59(57.8)
Hipertensión (-)	43(42.15)

Tabla 3. Características de la población

Las principales comorbilidades de los sujetos de estudio fueron las dislipidemias, 53.92% hipercolesterolemia y 54.9% Hipertrigliceridemia, la angina estable se observó en el 41.18% de los pacientes. El infarto agudo al miocardio en el 27.45%, taquicardia supraventricular en el 10.78% al igual que la dispepsia.

Enfermedad	N	Porcentaje (%)
Infarto Agudo al Miocardio	28	27.45
Angina inestable	10	9.80
Angina Estable	42	41.18
Ataque Isquémico		
Transitorio	5	4.90
Taquicardia		
supraventricular	11	10.78
Taquicardia ventricular	2	1.96
Sincope neuro		
cardiogénico	8	7.84
Hipercolesterolemia	55	53.92
Hipertrigliceridemia	56	54.90
Valvulopatías	1	0.98
Bloqueos	4	3.92
Insuficiencia cardiaca	2	1.96
Síndrome X	3	2.94
Hipotiroidismo	5	4.90
Hipertiroidismo	1	0.98
Hiperplasia prostática	5	4.90
Dispepsia	11	10.78
Cáncer	4.0	3.92

Tabla 4. Principales comorbilidades.

Los fármacos utilizados por los pacientes al momento del estudio fueron clopidogrel y aspirina en el 100% de los pacientes, estatinas en un 85% y b-bloqueadores en un 71%. Los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II) fueron utilizados por el 56% de los pacientes. Durante el periodo del estudio el grupo de investigación se aseguró que el paciente tomara su tratamiento farmacológico, incluido el Clopidogrel diariamente, mediante llamadas telefónicas del personal de enfermería a cada paciente.

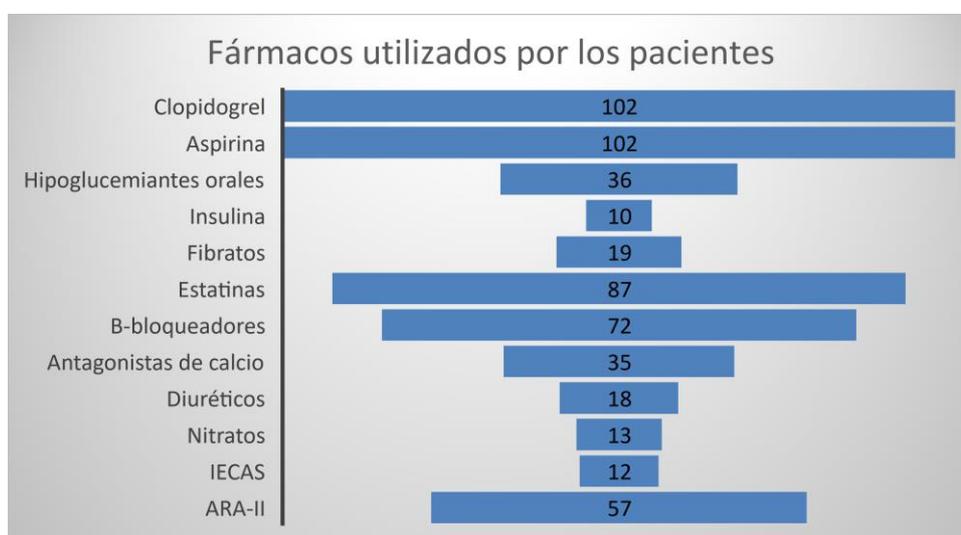


Figura 4. Principales fármacos utilizados por los pacientes.

Determinación de la antiagregación plaquetaria

Se determinó la antiagregación plaquetaria al clopidogrel, alcanzada después de una dosis de mantenimiento de al menos 75 mg/día durante un periodo no menor de 9 días.

El 73.5 % de los pacientes presento menos de 234 unidades de Reacción P2Y12 (PRU), mientras que el 26.5% presentó igual a más de 235 PRU (tabla 5).

Antiagregación Plaquetaria Verify Now	N= 102	%
< 234 PRU	75	73.5
≥ 235 PRU	27	26.5

Tabla 5. Determinación de la antiagregación plaquetaria en VerifyNow

De acuerdo con los resultados de la agregometría, los pacientes fueron clasificados en tres grupos. Grupo 1) 47 pacientes (46%) se clasificaron como buenos respondedores, con un nivel de PRU ≤ 194 que evidencia un bloqueo $> 40\%$ del receptor P2Y12; Grupo 2) 28 pacientes (27,5%) con un nivel de PRU de 194-235 (20 a 40% de bloqueo del receptor P2Y12), clasificados como respondedores intermedios y; Grupo 3) 27 pacientes (26,5%) con ≥ 235 PRU ($< 20\%$ de bloqueo del receptor P2Y12) como respondedores pobres.

Clasificación según resultados del Verify Now: Unidades PRU y % de Antiagregación Plaquetaria

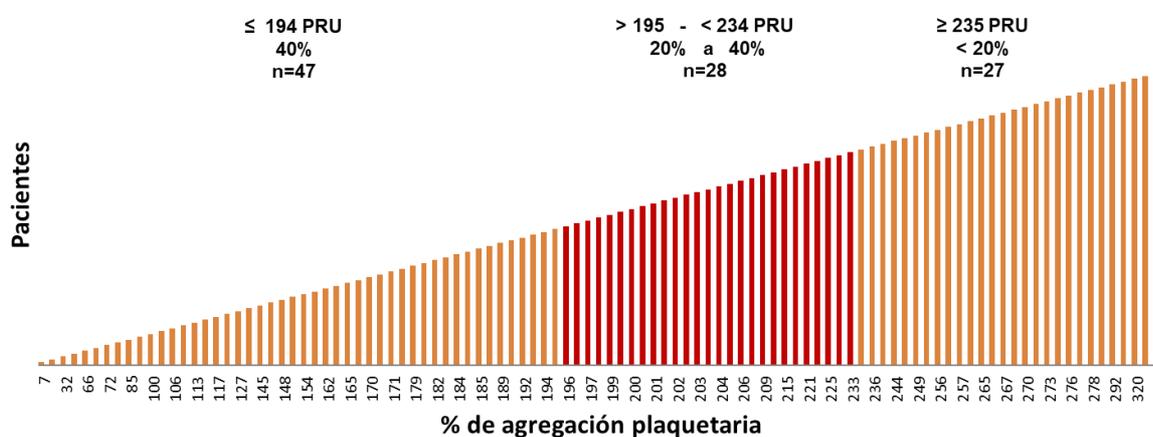


Figura 5. PRU y porcentaje de antiagregación plaquetaria

Determinación del polimorfismo

Se determinó el polimorfismo genético CYP2C19*2(681G>A, dbSNP rs4244285) a través de PCR en tiempo real en pacientes con alto riesgo cardiovascular. El análisis se llevó a cabo utilizando discriminación alélica y se designaron los genotipos correspondientes. Los posibles genotipos fueron GG, GA y AA. En la figura 3 se observa el plot de discriminación alélica para los portadores y no portadores de la variante CYP2C19*2. Homocigoto normal G/G (azul), Heterocigoto G/A (verde) y Homocigoto mutado A/A (rojo).

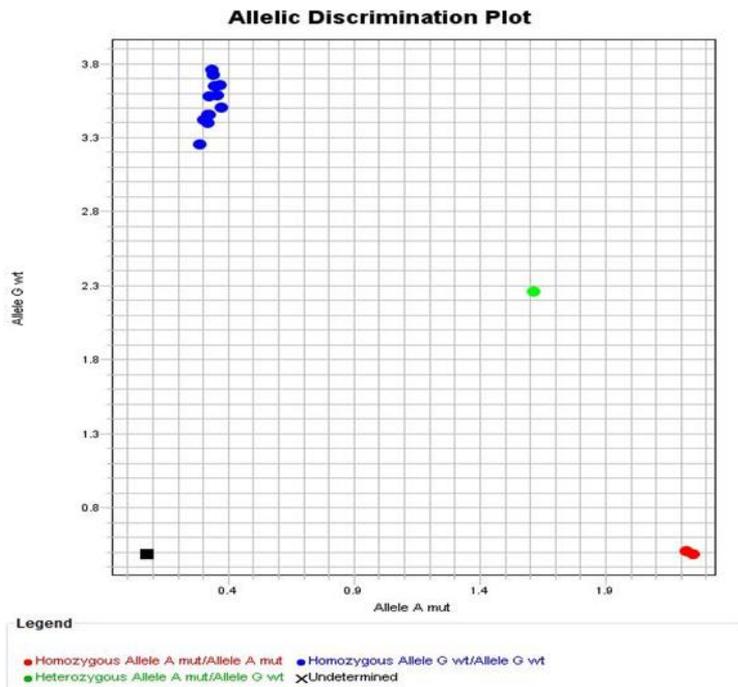


Figura 6. Análisis de discriminación alélica.

Análisis de la frecuencia genotípica

Un total de 102 pacientes del noreste de México con diagnóstico de alto riesgo de enfermedad cardiovascular fueron genotipados para CYP2C19 * 2 (681G> A, dbSNP rs4244285). Las frecuencias genotípicas obtenidas fueron 74.5% (G / G), 21.6% (G / A) y 3.9% (A / A) (tabla 6).

n=102	Genotipo	
	n	fg (%)
GG	76	74.5
GA	22	21.6
AA	4	3.9

Tabla 6. Frecuencia genotípica.

Fenotipo metabolizador

Los pacientes se clasificaron según el estado del metabolizador del CYP2C19 según los genotipos * 2 utilizando la nomenclatura consenso común del alelo estrella como metabolizador normal (G / G), metabolizador intermedio (G / A) y metabolizador deficiente (A / A), respectivamente.

Alelo	Fenotipo	Frecuencia n (%)
GG	Normal	76(74.5)
GA	Intermedio	22(21.6)
AA	Pobre	4(3.9)

Tabla 7. Asociación genotipo- fenotipo

Asociación genotipo-fenotipo

La mayoría de los pacientes con niveles de PRU <235 presentaron el genotipo homocigótico G / G para la isoforma de tipo salvaje CYP2C19 * 1. En contraste, los pacientes que presentaron niveles de ≥ 235 PRU presentaron el SNP CYP2C19 * 2 en al menos un alelo (G / A o A / A). Este hallazgo indica que la función enzimática reducida de CYP2C19 muestra una diferencia significativa ($p = 0,003$) cuando se compara con la actividad enzimática de la isoforma de tipo salvaje CYP2C19 en la activación de clopidogrel.

Alelo	Fenotipo	Frecuencia n (%)	PRU
GG	Normal	76(74.5)	≤ 194- < 234
GA	IM	22(21.6)	≥ 235
AA	PM	4(3.9)	≥ 235

Tabla 8. Asociación genotipo-fenotipo metabolizador (PRU).

En la figura 6 se observa la diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de PRU y la presencia del polimorfismo. Fueron clasificados como portadores del polimorfismo los genotipos G/A y A/A, mientras que el genotipo G/G como no portador.

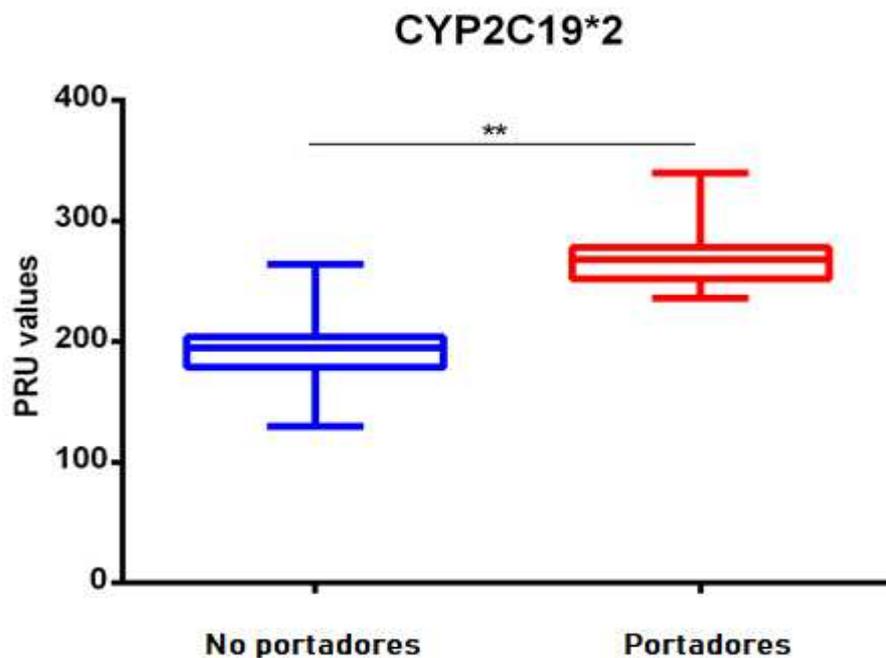


Figura 7. Niveles de PRU en portadores y no portadores del polimorfismo CYP2C19*2.

Análisis de asociación entre las características de la población y PRU

Se realizaron análisis de asociación entre las principales características de la población y los niveles de PRU (unidades de reacción P2Y12). Se identificó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.003$) a través una prueba de T entre los niveles de PRU y la presencia del polimorfismo. En el resto de las características no se observó diferencia estadísticamente significativa.

Factor	PRU (SD)	P
Hombres	199.10 (63.6)	0.332
Mujeres	185.7 (68.6)	
> 60 años	197.4 (66.9)	0.081
< 60 años	171 (63.5)	
Obesidad (+)	189.2 (68.7)	0.723
Obesidad (-)	194.4 (62.9)	
Diabetes Mellitus (+)	191.4 (69.3)	0.891
Diabetes Mellitus (-)	189.5 (62.9)	
Dislipidemia (+)	201.7 (66.0)	0.124
Dislipidemia (-)	181.3 (66.5)	
Tabaquismo (+)	193.7 (67.0)	0.474
Tabaquismo (-)	183.1 (66.6)	
No portadores	179.3 (67.1)	*0.003
Portadores	224 (54.4)	

Tabla 9. Asociación entre características de la población y niveles de PRU.

Capítulo VII

DISCUSIÓN

Clopidogrel tiene características farmacodinámicas muy especiales y complejas, entre las que se incluyen las siguientes: metabolismo hepático de primer paso, variación en la absorción, metabolismo de fármacos y SNPs en las enzimas responsables de su metabolismo. Como resultado, se observa una respuesta interindividual muy variable e impredecible a esta terapia que favorece el fracaso del tratamiento. La resistencia estimada a clopidogrel fluctúa entre el 4% y el 30% ²⁵. En nuestra población específica, no se han explorado los biomarcadores necesarios para medir la resistencia a esta terapia.

Este trabajo describe la presencia de CYP2C19 * 2 (681G> A) en un grupo de pacientes con alto riesgo cardiovascular en el área noreste de México con una frecuencia de genotipo de 74.5% para G / G, 21.6% para G / A y 3.9% para A/A. El alelo CYP2C19 * 2 estuvo presente en el 25,5% de los pacientes, con un 3,9% de genotipo homocigótico entre los pacientes. Este hallazgo está de acuerdo con un estudio anterior realizado en una muestra de 51 pacientes mestizos mexicanos de la región central de México con una frecuencia genética del 17% y el 3.9% de los pacientes con A / A de manera homocigótica

²².

CYP2C19 * 2 representa del 75-85% de los alelos responsables del fenotipo metabolizador pobre o deficiente en caucásicos y asiáticos orientales ²¹. Este alelo es significativamente más frecuente en las poblaciones de Asia oriental (14-39%) que entre los caucásicos (8-16%) y africanos (18-25%) ²¹. Mientras que, en coreanos, se informa que la frecuencia de CYP2C19 * 2 es del 28%, similar al 27% en la población japonesa, pero que muestra una gran diferencia con la población china ²¹. Para CYP2C19 * 2 se ha observado un patrón de transmisión de rasgos tanto autosómicos recesivos y autosómicos codominantes ^{26,27}.

De acuerdo con los resultados de la agregometría, el 46% de los pacientes se clasificaron como buenos respondedores, el 27,5% mostró de 20 a 40% del efecto de bloqueo P2Y12 y el 26,5% se clasificó como respondedores pobres. Esta observación concuerda con lo informado por Viveros et al., 2016, donde el 40% de los pacientes respondieron bien y el 60% no respondieron²². La mayoría de los pacientes (98,6%) con el genotipo G / G que presentaron niveles de PRU <234 se clasificaron como respondedores. En contraste, los portadores de al menos un alelo A (G / A y A / A) mostraron un PRU ≥235 que indica menos del 20% de efecto de bloqueo del P2Y12 y se clasificaron como pacientes resistentes o no respondedores (figura 8). Las discrepancias en la respuesta a los medicamentos se deben parcialmente a los polimorfismos en los genes involucrados en el metabolismo y el transporte de los medicamentos. Además, se ha demostrado que la frecuencia, el patrón y el impacto de estos polimorfismos varían entre las poblaciones^{28,29}.

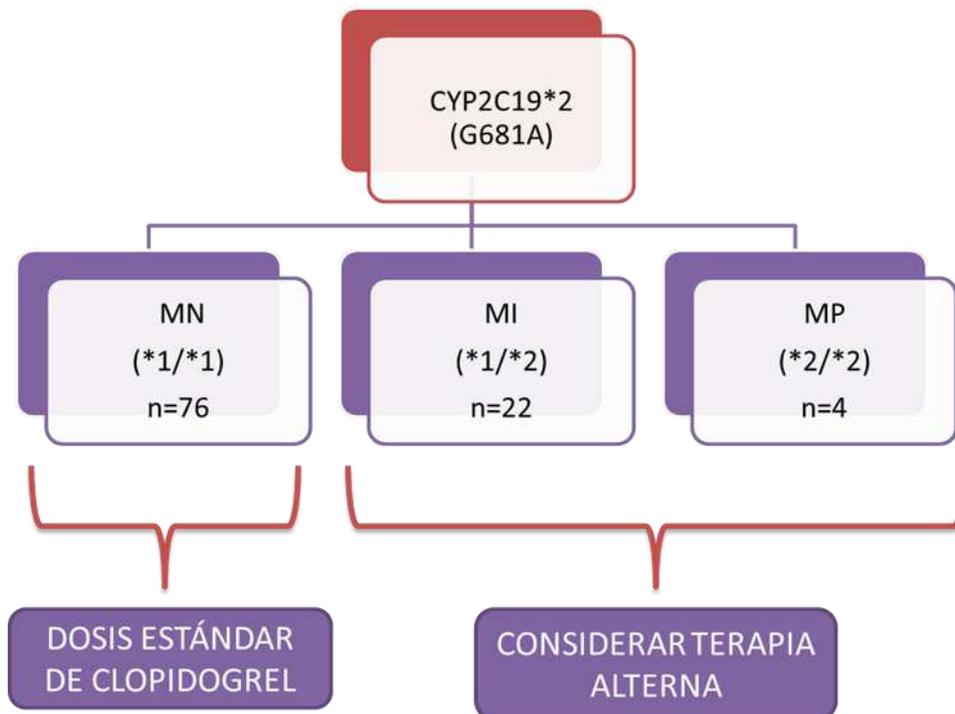


Figura 8. Fenotipo metabolizador y Genotipo.

El principal problema que enfrentan los médicos cuando prescriben agentes antiplaquetarios es la falta de un método estandarizado para la función antiplaquetaria. Además, no se ha establecido un punto de corte para esta función para proporcionar una clasificación clara del paciente como respondedor o no respondedor al tratamiento con CLO³⁰.

La resistencia a CLO se puede clasificar como resistencia clínica o basada en el laboratorio. La resistencia clínica podría definirse cuando ocurre un evento cardiovascular en una persona que actualmente recibe el tratamiento antiplaquetario. Mientras tanto, la resistencia basada en laboratorio se define como el fracaso in vitro de la actividad de bloqueo plaquetario de un individuo que actualmente se encuentra bajo tratamiento con CLO²⁹.

Se han propuesto varios métodos de laboratorio para el diagnóstico de resistencia antiplaquetaria CLO, pero todos ellos presentan ventajas y desventajas ³⁰. La gran variabilidad reportada en los niveles de resistencia a CLO se debe a la ausencia de una definición unificada de las pruebas de laboratorio actuales y La heterogeneidad en los diferentes grupos de estudio y protocolos.

Los resultados observados en esta cohorte reflejan la importancia tanto del análisis de los genotipos del CYP2C19, así como de las pruebas de agregación plaquetaria, como factores determinantes para predecir la respuesta y la resistencia a la CLO en pacientes con alto riesgo cardiovascular.

Capítulo VIII

CONCLUSIÓN

La prevalencia de una eficacia reducida de clopidogrel se asocia con la presencia de polimorfismo CYP2C19 * 2 entre los pacientes. Este hallazgo denota que la función enzimática reducida de CYP2C19 muestra una diferencia significativa ($p = 0,003$) cuando se compara con la actividad enzimática de la isoforma de tipo salvaje del CYP2C19 en la activación de clopidogrel.

Capítulo IX ANEXOS

Consentimiento informado

16. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

<i>Fecha</i>	<i>Firma de la Persona que Obtuvo el Consentimiento/Investigador Principal</i>	<i>Nombre en letra de Molde</i>
--------------	--	---------------------------------

8

<p style="text-align: center;"><small>COMITÉ DE INVESTIGACIÓN</small></p>  <p style="text-align: center;"><small>COMITÉ DE ÉTICA INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN</small></p>	<p>Formato de Consentimiento Versión1 (INSAR)</p> <p>Fecha: 03 de Junio de 2015</p>
--	---

Extracción de ADN con kit wizard genomic DNA purification

LISIS DE CÉLULAS

1. Combinar los volúmenes apropiados de: solución de lisis celular (900 μL) y de sangre total (300 μL).
2. Mezclar por inversión.
3. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 13 000 g^* durante 20 segundos.
5. Desechar el sobrenadante. Agitar la pastilla en el vórtex.

LISIS NUCLEAR Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

1. Agregar la solución de lisis nuclear (300 μL) y mezclar por inversión.
2. Añadir la solución de precipitación de proteínas (100 μL). Agitar en vórtex durante 20 segundos.
3. Centrifugar 13 000 g^* durante tres minutos.

PRECIPITACIÓN DE ADN Y REHIDRATACIÓN

1. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo conteniendo isopropanol (300 μL) y mezclar por inversión.
2. Centrifugar a 13 000 g^* durante un minuto.
3. Desechar con cuidado el sobrenadante. Añadir 70% de etanol (volumen igual de isopropanol).
4. Centrifugar a 13 000 g^* durante un minuto.
5. Aspirar el etanol y dejar secar de 10 a 15 minutos.

6. Reconstituir el ADN en un volumen apropiado de solución de rehidratación de ADN (100 μ L) e incubar una hora a 65 °C.

*Normalmente equivale a 12 000-14 000 RPM

Electroforesis en gel de agarosa- verificación de la integridad del ADN

1. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA AL 1%.

1.1 Pesar .35 g de agarosa y agregar 35 ml de TBE 1X, calentar a ebullición en una placa de calentamiento hasta disolver la agarosa.

1.2 Verter la agarosa en el molde, asegurando que no queden burbujas y colocar el peine en las ranuras correspondientes del molde. Dejar solidificar.

1.3 Desmontar el molde y colocarlo en la cámara de electroforesis.

1.4 Agregar TBE1X a la cámara de electroforesis hasta que cubra completamente el gel.

2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

2.1 Colocar 1µL de buffer de carga GelRed en un molde para carga limpio y seco.

2.2 Agregar 5 µL de muestra (DNA) y mezclar bien.

2.3 Depositar en los pocillos del gel las muestras bien mezcladas siguiendo un orden previamente establecido.

3. ELECTROFORESIS

3.1 Conectar correctamente los cables de la cámara en la fuente de poder. El cable que se encuentra hacia el lado donde se aplicaron las muestras conectarlo al polo negativo (cátodo/color negro) y el cable del otro extremo, hacia donde migraran las muestras conectarlo al polo positivo (ánodo/color rojo).

3.2 Ajustar el voltaje a 100 volts por 45 minutos.

4. FOTODOCUMENTACIÓN

4.1 Encender la PC y el equipo, Abrir el programa Quantity one, dar click en Select scanner, después seleccionar GEL DOC XR, abrir la puerta del equipo y encender la luz blanca. Acomode el gel en el centro lo cual puede observar en la ventana del programa. Cerrar la puerta del equipo y encender la lámpara UV. Obtener y guardar las imágenes.

Artículo original aceptado

19/6/2019

Permanyer online submission manuscript



Archivos
de Cardiología
de México



Inicio Mensajes Nuevo Salir Bienvenido: Lizeth Alejandra Martínez Jacobo

Código: ACM/0033/19/R1

Título: "Association of CYP2C19 * 2 polymorphism with Clopidogrel resistance among patients with high cardiovascular risk in northeastern Mexico"

Título breve: CYP2C19*2 and high cardiovascular risk

Estado: Aprobado para publicación

Tipo: Artículo de investigación

Palabras clave: CYP2C19*2, clopidogrel, high cardiovascular risk, polymorphism, resistance

Editor jefe: Alfonso Buendía

Comentarios:

Cronología: 17-01-2019 Pendiente de validación
18-01-2019 Pendiente de completar artículo
27-02-2019 Artículo completado y pendiente de validación
27-02-2019 Enviado a editor, pendiente de asignación de editor asociado
07-03-2019 Pendiente de asignación de revisor
12-03-2019 Asignado a revisor, pendiente de que acepte la invitación
20-03-2019 Dictamen pendiente de aprobación de editores
20-03-2019 Asignado a revisor, pendiente de que acepte la invitación
04-04-2019 Pendiente de dictamen de revisor
09-05-2019 Dictamen pendiente de aprobación de editores
09-05-2019 Devuelto con cambios mayores
09-05-2019 Revisiones de autor realizadas
09-05-2019 Correcciones validadas por coordinador
15-05-2019 Correcciones enviadas a revisor

03-06-2019 Aprobado para publicación

Resumen del artículo

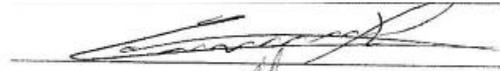
Carta de cesión de derechos

22/02/2019

Los abajo firmantes manifiestan que el artículo: "Association of CYP2C19 * 2 polymorphism with Clopidogrel resistance among patients with high cardiovascular risk in northeastern Mexico" es original, que no ha sido enviado a publicación en otra revista y que están de acuerdo con el orden de autoría y ceden los derechos de autoría a la revista ACM.

Félix R. Cedillo-Salazar

Primer Autor



Lizeth A. Martínez-Jacobo

Coautor



Yadira X. Pérez-Páramo

Coautor

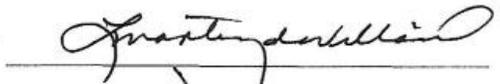
Yadira X. Pérez Páramo

Ricardo Cerda-Flores



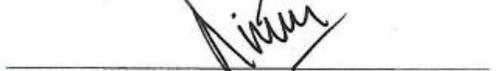
Laura E. Martínez

Coautor



José Carlos Jaime-Pérez

Coautor



María Guadalupe Moreno-Treviño

Coautor



Edelmiro Pérez-Rodríguez

Coautor



Francisco J. Bosques-Padilla

Coautor



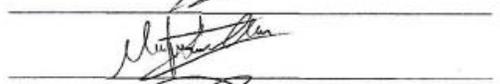
Edelmiro Pérez-Rodríguez

Coautor



Montserrat Cedillo-Ávila

Coautor



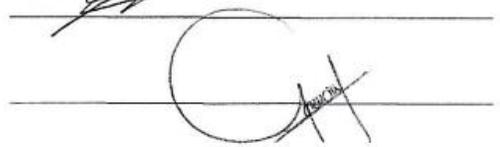
María A. Cedillo-Ávila

Coautor



Michelle Zamudio- Osuna

Coautor



“Association of CYP2C19 * 2 polymorphism with Clopidogrel resistance among patients with high cardiovascular risk in northeastern Mexico”

"Asociación del polimorfismo CYP2C19 * 2 con resistencia a Clopidogrel en pacientes con alto riesgo cardiovascular en el noreste de México"

Running title: CYP2C19 * 2 and high cardiovascular risk

Félix R. Cedillo-Salazar ¹, Lizeth Martínez-Jacobo^{2*}, Yadira X. Pérez-Páramo M³, Ricardo Cerda-Flores⁴, Laura E. Martínez⁵, José C. Jaime- Pérez⁶, María G. Moreno- Treviño², Edelmiro Pérez-Rodríguez⁷, Francisco J. Bosques-Padilla⁸ Montserrat Cedillo-Ávila¹, María A. Cedillo-Ávila ⁹ and Michelle Zamudio-Osuna⁵.

1. Servicio de Cardiología, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico.
2. Departamento de Ciencias Básicas, Vicerrectoría de Ciencias de la Salud, Universidad de Monterrey, San Pedro Garza García, Nuevo León, Mexico.
3. College of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, Washington State University, Spokane, WA, USA.
4. Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico.
5. Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico.

6. Servicio de Hematología, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico.
7. Servicio de Cirugía General, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico.
8. Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico.
9. Escuela de Medicina, Universidad Del Valle de México, Monterrey, Nuevo León, México.

***Corresponding author:**

Departamento de Ciencias Básicas, Vicerrectoría de Ciencias de la Salud,
Universidad de Monterrey. Av. Morones Prieto 4500, San Pedro Garza García,
Nuevo León, México. C.P. 66238

Tel.: +52 (81) 82151000 ext. 1225

Email: liz_qcb88@hotmail.com , lizeth.martinezi@udem.edu

Funding

The present investigation has not received specific grants from agencies of the public sector, commercial sector or nonprofit entities.

Conflicts of Interests

None

Acknowledgements

We wish to thank all patients who generously participated in this study.

“Association of CYP2C19 * 2 polymorphism with Clopidogrel resistance among patients with high cardiovascular risk in northeastern Mexico”

Abstract

Objective: Oral antiplatelet drugs are a key of modern pharmacotherapy in cardiovascular atherothrombotic diseases. Clopidogrel (CLO) constitute the main preventive treatment of atherothrombosis (AT). However, a considerable inter-individual variation in CLO response has been documented, resulting in suboptimal therapy and an increased risk of recurrent adverse effects in some patients. The enzyme CYP2C19 has been reported to be the CYP isoform that activates CLO to its active metabolite. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CYP2C19 gene have been identified as strong predictors of CLO impaired pharmacological response. At least 16 variants have been associated with changes in CYP2C19 activity.

Methods: The following research was composed by a total of 102 subjects with high cardiovascular risk in the northeast of Mexico, with a maintenance dose of 75mg of CLO per day. The platelet reactivity was measured with VerifyNowP2Y12 assay, while the presence of CYP2C19*2 was identified by real-time PCR.

Results: Patients were categorized by CYP2C19 metabolizer status based on *2 genotypes using the common consensus star allele nomenclature as normal metabolizer (G/G), intermediate metabolizer (G/A) and poor metabolizer (A/A), respectively. The phenotype frequency for CYP2C19*2 was 74.5% (G/G), 21.6% (G/A) and 3.9% (A/A). The subjects with the A allele presented ≥ 235 PRU levels,

classifying them how poor metabolizer. The prevalence of a reduced CLO effectiveness was associated with the presence of CYP2C19*2 polymorphism among Mexican patients.

Conclusion: The presence of the CYP2C19 * 2 allele is related to resistance to the antiplatelet effect of clopidogrel ($p = 0.003$).

Key words: CYP2C19*2; Clopidogrel; High cardiovascular risk; Polymorphism; Resistance; Allele.

"Asociación del polimorfismo CYP2C19 * 2 con resistencia a Clopidogrel en pacientes con alto riesgo cardiovascular en el noreste de México"

Resumen

Objetivo: Los antiplaquetarios orales son clave en la farmacoterapia moderna de las enfermedades aterotrombóticas cardiovasculares. Clopidogrel (CLO) constituye el principal tratamiento preventivo de aterotrombosis (AT). Sin embargo, se ha documentado una considerable variación interindividual en la respuesta a CLO, lo que da como resultado una terapia subóptima y mayor riesgo de efectos adversos en algunos pacientes. La enzima CYP2C19 es la isoforma CYP que activa CLO a su metabolito activo. Se han identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen CYP2C19 como fuertes predictores de respuesta farmacológica alterada a CLO. Al menos 16 variantes se han asociado con cambios en la actividad de CYP2C19.

Método: Se reclutaron un total de 102 sujetos con alto riesgo cardiovascular del noreste de México, con dosis de mantenimiento de 75 mg de CLO/día. La

reactividad plaquetaria se midió con el ensayo VerifyNowP2Y12, la presencia de CYP2C19*2 se identificó mediante PCR en tiempo real.

Resultado: Los pacientes fueron clasificados por el estado metabolizador CYP2C19*2 utilizando nomenclatura consenso, como metabolizador normal (G/G), metabolizador intermedio (G/A) y metabolizador pobre (A/A), respectivamente. La frecuencia del fenotipo para CYP2C19*2 fue 74.5% (G/G), 21.6% (G/A) y 3.9% (A/A). Los sujetos con alelo A presentaron ≥ 235 niveles PRU, clasificándolos como metabolizadores deficientes. La prevalencia de eficacia reducida a CLO se asoció con la presencia del polimorfismo CYP2C19*2 en pacientes mexicanos.

Conclusiones: La presencia del alelo CYP2C19*2 se relaciona con resistencia al efecto antiagregante plaquetario del clopidogrel ($p = 0,003$).

Palabras clave: CYP2C19*2; Clopidogrel; Alto riesgo cardiovascular; Polimorfismo; Resistencia; Alelo.

Capítulo X

BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart, J., Manmathan, G. & Wilkinson, P. Primary prevention of cardiovascular disease : A review of contemporary guidance and literature. *JRSM Cardiovasc Dis* **6**, 1–9 (2017).
2. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en> (2016).
3. OMENT. Un panorama de las enfermedades cardiovasculares. *Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles / Universidad Autónoma de Nuevo León* (2018).
4. Viles-Gonzalez, J. F., Fuster, V. & Badimon, J. J. Atherothrombosis: A widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur. Heart J.* **25**, 1197–1207 (2004).
5. López, A. & Macaya, C. Plaqueta : fisiología de la activación y la inhibición. *Rev. Esp. Cardiol.* **13**, 2–7 (2013).
6. Raudales, J. C., Zago, A. C., Casco, M. F. De, Bortolini, M. A. G. & Flores, I. V. C. Patofisiología De La Placa Coronaria Aterosclerótica Vulnerable Y Síndromes Coronarios Agudos. *REV MED HONDUR* **83**, 57–65 (2015).
7. Badimón, L., Vilahur, G. & Padró, T. Lipoproteínas , plaquetas y aterotrombosis. *Rev. Esp. Cardiol.* **62**, 1161–1178 (2009).
8. Weiss JG. *Anatomy and structural organization of the platelet.* (1994).
9. Gómez-gómez, B., Rodríguez-weber, F. L., Díaz-greene, J. & Díaz-greene, J. Fisiología plaquetaria , agregometría plaquetaria y su utilidad clínica Platelet physiology , platelet aggregometry and their clinical usefulness . *Med. Interna México* **34**, 244–263 (2018).
10. Sharathkumar Anjali A. & Shapiro, A. D. Trastornos de la función plaquetaria. *Tratamiento de la hemofilia* **19**, (2008).
11. Iván F. Palomo G., C. I. T. U., Moore-Carrasco., R. E., A., M., L., A. & L.,

- P. J. M. Antiagregantes Plaquetarios : Mecanismos De Acción Y Riesgos Asociados Al Uso. *VITAE* **16**, 133–143 (2009).
12. Antònia Agustí y Montserrat Bosch. Prevención de la enfermedad aterotrombótica con la combinación de dos antiagregantes plaquetarios. *Med Clin* **127**, 153–155 (2006).
 13. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, H. M. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: A systematic review and meta-analysis. *Am Hear. J* **154**, 221–231 (2007).
 14. Dean, L. Clopidogrel Therapy and CYP2C19 Genotype. *Med. Genet. Summ. [Internet]*. 1–18 (2018).
 15. S, L. Q. *et al.* fármacos antineoplásicos : Situación actual y perspectivas terapéuticas. *Rev Méd Cihile* **136**, 1327–1335 (2008).
 16. Teresa, M. & Gualix, Y. J. Polimorfismo de los citocromos P-450. Importancia fisiopatológica y farmacológica. 91–122 (1963).
 17. Torrades, S. Diversidad del genoma humano : los polimorfismos. *OFFARM* **21**, 122–126 (2002).
 18. Herrera-paz, E. F. La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *REV MED HONDUR* **81**, 40–45 (2013).
 19. Ignal, A. V & Ilan, D. M. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* **34**, 275–305 (2002).
 20. PharmVar. Pharmacogene Variation. (2017).
 21. Shin, D. J. *et al.* Association of CYP2C19*2 and *3 genetic variants with essential hypertension in Koreans. *Yonsei Med. J.* **53**, 1113–1119 (2012).
 22. Viveros, M. E. *et al.* Evaluation of clopidogrel response variability and identification of the CYP2C19 polymorphism in Mexican patients. *Arch. Cardiol. México* **86**, 297–304 (2016).
 23. Koltai, K., Kesmarky, G., Feher, G., Tibold, A. & Toth, K. Platelet aggregometry testing: Molecular mechanisms, techniques and clinical implications. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–21 (2017).
 24. Castro, A. D. M. *et al.* La reactividad plaquetaria post-tratamiento predice los eventos adversos a largo plazo mejor que la respuesta al clopidogrel en pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST. *Rev. Esp. Cardiol.* **62**, (2009).
 25. Nguyen, T. A. *et al.* Resistance to Clopidogrel : A Review of the Evidence.

- J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1157–64 (2005).
26. Brøsen K, de Morais SM, Meyer UA, G. J. A multifamily study on the relationship between CYP2C19 genotype and s-mephenytoin oxidation phenotype. *Pharmacogenetics* **5**, 312–7 (1995).
 27. Morais, S. M. F. de *et al.* Genetic analysis of the S-mephenytoin polymorphism in a chinese population. *Pharmacokinet. Drug Dispos.* **58**, 404–411 (1995).
 28. Herrera-González, S. *et al.* Effect of AGTR1 and BDKRB2 gene polymorphisms on atorvastatin metabolism in a Mexican population. *Biomed. Reports* 579–584 (2017). doi:10.3892/br.2017.1009
 29. Kuliczkowski, W. *et al.* Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: A position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working . *Eur. Heart J.* **30**, 426–435 (2009).
 30. Paniccia, R., Priora, R., Liotta, A. A. & Abbate, R. Platelet Function tests: A Comparative Review. *Vasc. Health Risk Manag.* **11**, 133–148 (2015).

Capítulo XI

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Félix Ramón Cedillo Salazar

Candidato para el grado de
Doctor en Medicina

Tesis:

**PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA AL CLOPIDOGREL Y SU
ASOCIACIÓN CON EL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA CYP2C19*2 EN
PACIENTES CON ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR DEL NORESTE DE
MÉXICO**

Campo de estudio: Farmacogenética

Biografía

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 21 de enero de 1966, hijo de Guadalupe Evaristo Cedillo Garza y María Teresa Salazar Escamilla.

Educación: Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Médico Cirujano y Partero en el año de 1989.

Egresado de la especialidad en Medicina Interna en 1994 y de la subespecialidad médica en Cardiología-Hemodinámica en 1996 ambas en la Facultad de Medicina de la UANL. Fellow en Electrofisiología Cardíaca, en el Texas Arrhythmia Institute de Houston, Texas de 1996-1997. Fellow del American College of Cardiology (FACC) desde el año 2013 y del Heart Rhythm Society (FHRS) desde el año 2015.

Experiencia profesional: Miembro de la Junta de Gobierno de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAЕ) No.34 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del año 2004 a la fecha; Director del Instituto para las Arritmias Cardíacas y Diagnóstico Cardiovascular, SC; Profesor Titular de la licenciatura de Medicina y de los posgrados de Medicina Interna y Cardiología-Hemodinámica de la Facultad de Medicina de la UANL de 1998 a la fecha; Coordinador del Área de Electrofisiología Cardíaca del Servicio de Cardiología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la UANL. desde 2004 a la fecha; Subdirector de Educación Continua de la Facultad de Medicina de la UANL del 2010 al 2017; Concejal Ciudadano Regidor por el Municipio de Monterrey, Nuevo León por el Partido Morena del 2018 al 2019; Coordinador del grupo de Concejales Ciudadanos Regidores del Municipio de Monterrey por parte del Partido Morena, del 2018 al 2019.

Organizaciones profesionales: Miembro Titular de la Sociedad Mexicana de Cardiología. Miembro de la Asociación Nacional de Cardiólogos de México (ANCAM); Miembro de la Sociedad de Médicos del Hospital Siglo XXI “La Raza” de México; Fundador y Miembro de la Sociedad Mexicana de Electrofisiología y

Estimulación Cardíaca (SOMECC); Miembro de la Sociedad Europea de
Cardiología (ESC); Miembro de la European Heart Rhythm Society; Miembro de
la European Association of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation;
Miembro de la European Association of Cardiovascular Intervention; Miembro y
Ex-Presidente de la Sociedad Regiomontana de Cardiología.