

## Artículo original

# Influencia de los polimorfismos de CYP2C19 en la reactividad plaquetaria y el pronóstico en una población no seleccionada de pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST

Antonio Tello-Montoliu<sup>a</sup>, Eva Jover<sup>a</sup>, Francisco Marín<sup>a,b</sup>, Agustina Bernal<sup>b,c</sup>, María L. Lozano<sup>b,c</sup>, Beatriz Sánchez-Vega<sup>b,c</sup>, Francisco J. Pastor<sup>a,b</sup>, José A. Hurtado<sup>a,b</sup>, Mariano Valdés<sup>a,b</sup>, Vicente Vicente<sup>b,c</sup> y José Rivera<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, España

<sup>b</sup>Universidad de Murcia, Murcia, España

<sup>c</sup>Centro Regional de Hemodonación, Murcia, España

### Historia del artículo:

Recibido el 23 de febrero de 2011

Aceptado el 12 de julio de 2011

On-line el 23 de noviembre de 2011

### Palabras clave:

Angina inestable

Inhibidores de la agregación plaquetaria

Plaquetas

CYP2C19

### RESUMEN

**Introducción y objetivos:** Los alelos CYP2C19\*2 y \*17 parecen relacionarse con la variabilidad en el metabolismo del clopidogrel. Los objetivos del presente estudio son valorar la relación fenotipo-genotipo asociada a los polimorfismos CYP2C19\*2 y \*17 y explorar el impacto clínico de estos polimorfismos durante 6 meses de seguimiento en una población no seleccionada con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST.

**Métodos:** Se reclutó a 40 pacientes estables doblemente antiagregados, 12 meses después del implante de *stent* coronario para el primer objetivo, y a 493 pacientes ingresados con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST para el segundo. La reactividad plaquetaria se evaluó mediante agregometría óptica estimulando las plaquetas con adenosina difosfato o péptido activador del receptor de trombina, y valorando la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores fosforilada mediante citometría de flujo. El genotipo para los polimorfismos CYP2C19\*2 y \*17 se analizó con sondas TaqMan.

**Resultados:** Sólo el test de fosforilación de fosfoproteína estimulada por vasodilatadores mostró diferencias significativas en la reactividad plaquetaria entre los pacientes portadores y no portadores de los alelos CYP2C19\*2 ( $p = 0,020$ ) y \*17 ( $p = 0,048$ ). No se observó asociación con el pronóstico a 6 meses de los alelos CYP2C19\*2 ([HR (IC95%): 1 (0,94-1,55)],  $p = 0,984$ ) y \*17 ([HR (IC95%): 0,93 (0,61-1,43)],  $p = 0,753$ ).

**Conclusiones:** Los polimorfismos de CYP2C19 \*2 y \*17 se relacionaron con la reactividad plaquetaria, pero no con el pronóstico a 6 meses, en el que multitud de variables deben influir.

© 2011 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Influence of CYP2C19 Polymorphisms in Platelet Reactivity and Prognosis in an Unselected Population of Non ST Elevation Acute Coronary Syndrome

### ABSTRACT

**Introduction and objectives:** CYP2C19\*2 and CYP2C19\*17 alleles appear to contribute to heterogeneous clopidogrel metabolism. The aims of the present study were to assess the phenotype-genotype relationship of CYP2C19\*2 and \*17 allele carriage and to explore the clinical impact of those polymorphisms at 6-month follow-up of an acute event in an unselected population of non-ST elevation acute coronary syndrome.

**Methods:** Recruitment for the first and second objectives was 40 stable acute coronary syndrome patients under dual antiplatelet therapy at 12 months after coronary stent placement and an unselected population of 493 consecutive patients with non-ST elevation acute coronary syndrome, respectively. Platelet reactivity was assessed by optical aggregometry induced by adenosine diphosphate and thrombin receptor activating peptide, and by vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation measurement using flow cytometry. Genotypes were determined with a TaqMan assay.

**Results:** Only the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation measurement detected significant differences in on-clopidogrel platelet reactivity between the wild-type subjects and the CYP2C19\*2 ( $P = .020$ ) and \*17 allele carriers ( $P = .048$ ). No significant difference was found between CYP2C19\*2 ([HR (95%CI): 1 (0.94-1.55)],  $P = .984$ ) or \*17 ([HR (95%CI): 0.93 (0.61-1.43)],  $P = .753$ ) allele carriage and the occurrence of adverse events at 6-month follow-up.

### Keywords:

Unstable angina

Platelet aggregation inhibitors

Platelets

CYP2C19

### VÉASE CONTENIDO RELACIONADO:

DOI: 10.1016/j.recesp.2011.09.024. Rev Esp Cardiol. 2012;65:205-7.

\* Autor para correspondencia: Centro Regional de Hemodonación, Ronda de Garay s/n, 30003 Murcia, España.

Correo electrónico: jose.rivera@carm.es (J. Rivera).

**Conclusions:** Even though CYP2C19 genotype is associated with variable on-clopidogrel platelet reactivity, it has no significant clinical influence. Prognosis of acute coronary syndromes may be influenced by a myriad of variables.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

© 2011 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Abreviaturas

CYP: citocromo P450  
 ICP: intervención coronaria percutánea  
 IFM: intensidad de fluorescencia media  
 PRI-VASP: índice de reactividad plaquetaria-fosfoproteína estimulada por vasodilatadores  
 SCASEST: síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST  
 TRAP: péptido activador del receptor de trombina

## INTRODUCCIÓN

El clopidogrel es un profármaco que debe ser biotransformado para inhibir irreversiblemente al receptor de adenosina difosfato (ADP) P2Y<sub>12</sub>. La biotransformación del clopidogrel a su derivado tiol activo requiere dos pasos oxidativos en los que intervienen isoenzimas del citocromo P450 (CYP) hepático, como CYP2C19, 3A4/5, 1A2, 2B6 y 2C9<sup>1</sup>. Algunos estudios indican que los polimorfismos del CYP pueden ser causa, al menos en parte, de la heterogeneidad de la respuesta al clopidogrel<sup>2</sup>. Recientemente, se ha analizado la contribución *in vitro* de cada CYP, y se ha demostrado<sup>1</sup> que el metabolismo del clopidogrel depende principalmente del CYP2C19. Así, los alelos de pérdida de función del CYP2C19, como el alelo \*2, se asocian a un deterioro de la conversión del clopidogrel en su metabolito activo, una mayor reactividad plaquetaria durante el tratamiento con clopidogrel y una mala evolución clínica, en especial por el aumento del riesgo de trombosis del *stent*<sup>3-5</sup>. En cambio, el alelo CYP2C19\*17 se asocia a una potenciación de la respuesta plaquetaria al clopidogrel<sup>6</sup>, y los portadores de esta variante polimórfica podrían obtener mayor beneficio que los no portadores con tal tratamiento<sup>7</sup>. Sin embargo, no está clara todavía la trascendencia clínica de los alelos CYP2C19\*2 y \*17; los análisis recientes de otras series de pacientes han mostrado resultados contradictorios en cuanto a la relación entre la eficacia del clopidogrel y el estado de portador de los alelos<sup>3-7</sup>.

Los objetivos de nuestro estudio son evaluar la relación fenotipo-genotipo asociada a los polimorfismos CYP2C19\*2 y \*17 en 40 pacientes estables doblemente antiagregados mediante el empleo de diferentes métodos de valoración de la función plaquetaria y explorar la influencia pronóstica de estos polimorfismos en una cohorte no seleccionada de 493 pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST (SCASEST) a los 6 meses de seguimiento.

## MÉTODOS

### Pacientes

Para el primer objetivo, incluimos a 40 pacientes caucásicos estables en tratamiento de antiagregación doble con ácido acetilsalicílico y clopidogrel. A todos ellos se les realizó

intervención percutánea coronaria (ICP) e implante de *stent*, por recurrencia de eventos, en los 12 meses previos a la inclusión en el estudio. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad > 18 años, ausencia de trastornos hemorrágicos o contraindicaciones para el tratamiento doble antiagregante y ausencia de eventos isquémicos que hubieran requerido hospitalización durante al menos los 6 meses previos a la inclusión en el estudio. Se obtuvieron las características clínicas y demográficas, así como información detallada de la ICP a partir de las historias clínicas. Se implantaron *stents* metálicos convencionales o liberadores de fármacos, siguiendo las recomendaciones actuales, según el criterio del cardiólogo intervencionista. Después de la intervención, se continuó con la administración de dosis de mantenimiento de ácido acetilsalicílico a razón de 100 mg/día y clopidogrel a razón de 75 mg/día, según los protocolos actuales<sup>8</sup>.

Para el segundo objetivo, reclutamos a 493 pacientes caucásicos consecutivos diagnosticados de SCASEST admitidos en tres hospitales terciarios españoles. Se excluyó a 65 pacientes a causa de una interrupción temprana del tratamiento con clopidogrel. Por ello, finalmente se dio seguimiento durante 6 meses a 428 pacientes. Incluimos a pacientes que acudieron al servicio de urgencias y cumplían al menos dos de los siguientes criterios: a) dolor torácico típico; b) alteraciones electrocardiográficas que indicaran isquemia, como la depresión del segmento ST  $\geq 0,5$  mm en al menos dos derivaciones consecutivas o la inversión de la onda T  $\geq 0,2$  mV, y c) elevación de los valores de troponina T por encima del punto de corte ( $\geq 0,1$  ng/ml). Se excluyó a los pacientes con enfermedades infecciosas/inflamatorias concomitantes, discrasias hematológicas o contraindicaciones para el tratamiento antiagregante. Todos los pacientes recibieron un tratamiento estándar según lo recomendado en las guías actuales para el SCA<sup>8</sup>, doble terapia antiagregante, inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa, así como bloqueadores beta, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina, heparina de bajo peso molecular y estatinas cuando era apropiado. Además, se calculó la puntuación de riesgo TIMI para el SCASEST en todos los pacientes<sup>9</sup>. Posteriormente se realizó una angiografía coronaria y/o una ICP, a criterio del cardiólogo responsable. El seguimiento a 6 meses se realizó mediante visitas ambulatorias, contactos telefónicos y revisión de las historias clínicas. Identificamos como «eventos adversos»: muerte cardiovascular o síndrome coronario agudo recurrente que requiriera ingreso hospitalario. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio fue aprobado por el comité ético local.

### Procedimientos de laboratorio

Para el primer objetivo, se extrajeron muestras de sangre a las ocho de la mañana en la clínica ambulatoria, tras una noche en ayunas, sin haber fumado ni consumido bebidas con alcohol o cafeína. En el momento de obtención de las muestras, todos los pacientes recibían diariamente doble terapia antiagregante (100 mg de ácido acetilsalicílico y 75 mg de clopidogrel). Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa, en tubos con citrato trisódico al 3,2% para las pruebas de reactividad plaquetaria o en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para la obtención de ADN genómico. Se obtuvo plasma rico en

plaquetas para los tests de agregación, a partir de sangre citrada, mediante centrifugación a 150/g durante 10 min a temperatura ambiente, y se utilizó sin un ajuste para el recuento de plaquetas, en un plazo de 3 h tras la obtención de la muestra de sangre.

Para el segundo objetivo, se obtuvieron muestras de sangre venosa en las primeras 48 h tras el ingreso del paciente, siempre antes de la angiografía coronaria, utilizando suero y tubos con EDTA. Para los tests de ADN genómico (ambos objetivos), se utilizaron tubos con EDTA que se centrifugaron a 1.500/g durante 12 min a temperatura ambiente; se recogieron los estratos de leucocitos que se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta realizar el análisis por lotes. Las concentraciones de troponina T de los pacientes con SCASEST se determinaron en muestras séricas al ingreso y a las 6 y 12 h posteriores, utilizando un enzoinmunoanálisis de un solo paso, con tecnología de electroquimioluminiscencia (Elecsys, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza).

## Pruebas de función plaquetaria

### Pruebas de agregación plaquetaria

La agregometría de transmisión óptica se realizó en un agregómetro estándar (Aggregometer II, Menarini Diagnostics, Florencia, Italia) a  $37^{\circ}\text{C}$  y 1.000 rpm. Se monitorizaron los cambios de la transmisión óptica durante 5 min en plasma rico en plaquetas no ajustado para el recuento de plaquetas<sup>10</sup> tras la estimulación con: ADP a concentraciones de  $5\ \mu\text{M}$  y  $10\ \mu\text{M}$  (DiaMed, Cressier, Suiza) y péptido activador del receptor de trombina (TRAP) a  $25\ \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, Estados Unidos). El criterio de valoración de la reactividad plaquetaria corresponde al máximo porcentaje de luz transmitida, tomando el plasma autólogo pobre en plaquetas como la referencia del 100%. La agregación inducida por TRAP se empleó como control intraanalítico positivo en cada paciente, ya que la respuesta plaquetaria al péptido está mediada por el receptor de trombina receptor 1 activador de proteasa, y las tienopiridinas no la bloquean.

### Índice de reactividad plaquetaria-fosfoproteína estimulada por vasodilatadores

La determinación de los valores de fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) fosforilada es un indicador de la reactividad de P2Y<sub>12</sub> y, por lo tanto, de la inhibición inducida por clopidogrel<sup>11</sup>. Los valores de VASP fosforilada se cuantificaron mediante la determinación del índice de reactividad plaquetaria (PRI) mediante citometría de flujo (Beckman Coulter FC500, Miami, Florida, Estados Unidos) utilizando anticuerpos monoclonales marcados y siguiendo las instrucciones del proveedor (Platelet VASP, Diagnostica Stago, Biocytex Inc., Marsella, Francia). La población de plaquetas se identificó por las distribuciones de dispersión frontal y lateral hasta objetivar 5.000 eventos. El grado de fosforilación de VASP se determinó mediante la diferencia en los valores de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) en muestras incubadas con PGE<sub>1</sub> en presencia o en ausencia de ADP (IFM<sub>PGE1+ADP</sub> e IFM<sub>PGE1</sub>, respectivamente). Después de sustraer los valores de control isotópicos negativos de los valores de fluorescencia correspondientes, se calculó el PRI(%) con la siguiente fórmula:  $\text{PRI}(\%) = [(IFM_{\text{PGE1}}) - (IFM_{\text{PGE1+ADP}})] / (IFM_{\text{PGE1}}) \times 100$ . El cociente se expresó como reactividad plaquetaria porcentual media y es inversamente proporcional a la inhibición plaquetaria producida por clopidogrel.

## Determinación del genotipo

Se purificó el ADN genómico usando el Puragene Blood Core Kit B (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, Estados Unidos). El análisis genotípico de los polimorfismos CYP2C19\*2 (681G>A; rs4244285) y CYP2C19\*17 ( $-806\text{C}>\text{T}$ ; rs12248560) se realizó con TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Carlsbad, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando LC480 Real Time PCR (Roche, Basilea, Suiza). Se analizaron los genotipos sin conocer los valores de agregación plaquetaria ni la evolución clínica de los pacientes. Con objeto de asegurar un manejo correcto de las muestras, se repitió la genotipificación en el 20% de los pacientes, y se obtuvieron idénticos resultados. Se efectuó la determinación genotípica de las dos variantes alélicas en todos los pacientes incluidos en el estudio; por consiguiente, la tasa de determinación inequívoca (*call rate*) fue del 100%.

## Análisis estadístico

Las variables se presentan en forma de media  $\pm$  desviación estándar, recuentos (porcentajes) o mediana [intervalo intercuartílico]. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de los datos de las variables continuas. Las variables discretas se compararon utilizando la prueba de la  $\chi^2$ . Las de variables continuas se compararon con la prueba de la t de Student para datos no apareados bilateral o con la prueba de la U de Mann-Whitney según la distribución de los datos. Los cálculos para las variables de valoración de interés se basaron en la comparación del estado de portador de los alelos CYP2C19\*2 y CYP2C19\*17 en los individuos de tipo silvestre (G/G o C/C, respectivamente) y los portadores del alelo polimórfico (combinación de G/A y A/A, así como C/T y T/T, respectivamente). Se eligió un modelo dominante en ambos casos, ya que los alelos polimórficos \*/A o \*/T producen pérdida o ganancia completa de la función enzimática, lo cual significa que un alelo polimórfico ejerce un efecto relevante en la actividad enzimática total. La desviación respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó en ambas poblaciones con la prueba de la  $\chi^2$  para cada polimorfismo. Se analizó la proporción de riesgo relativo mediante regresión de Cox univariable sin ajustar, para comparar los eventos registrados durante el periodo de seguimiento entre los sujetos portadores de los alelos polimórficos y silvestres, tomando a los segundos como grupo de referencia en cada caso. Se calcularon las tasas de supervivencia totales con el método de Kaplan-Meier, y se determinaron las diferencias con *log rank*. Se aceptaron como estadísticamente significativos todos los valores de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos).

## RESULTADOS

### Relación entre el genotipo CYP2C19 y la reactividad plaquetaria durante el tratamiento

Las características clínicas basales de los 40 pacientes en los que se evaluó la reactividad plaquetaria durante el tratamiento se presentan en la *tabla 1*. De forma resumida, la media de edad de esa población era  $65,8 \pm 10$  años; 36 (90%) eran varones. A todos los pacientes se les había implantado al menos un *stent*; a 32 (80%) de ellos se les implantó *stents* liberadores de fármacos y a 8 (20%), *stents* convencionales. La distribución de genotipos fue la siguiente: el 77,5% GG, el 17,5% GA y el 5% AA para el polimorfismo CYP2C19\*2, y el 67,5% CC, el 30% CT y el 2,5% TT para el polimorfismo CYP2C19\*17. Para las distribuciones del genotipo CYP2C19\*17, no se observó ninguna

**Tabla 1**

Características basales de 40 pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST incluidos en el estudio del primer objetivo

Variable	Alelo CYP2C19*2		Alelo CYP2C19*17		Total
	G/G	*A	C/C	*T	
Pacientes, n (%)	31 (77,5)	9 (22,5)	27 (67,5)	13 (32,5)	40 (100)
Edad (años)	65,9 ± 8,9	65,6 ± 13,7	66,5 ± 10,7	64,1 ± 8,6	65,8 ± 10
Edad ≥ 65 años (%)	54,8	66,7	63	46,2	57,5
Varones (%)	93,5	77,8	85,2	100	90
Hipertensión (%)	78,6	66,7	68	91,7	75,7
Dislipemia (%)	64,3	44,4	52	75	59,5
Diabetes mellitus (%)	50	33,3	44	50	45,9
Tabaquismo (%)	25	0	16	25	18,9
SMC (%)	22,6	11,1	22,2	15,4	20
SLF (%)	77,4	88,9	77,8	84,6	80

SLF: *stent* recubierto de fármaco; SMC: *stent* metálico convencional.

La edad se expresa en media ± desviación estándar.

desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0,698$ ), no así para el CYP2C19\*2 ( $p = 0,009$ ).

La reactividad plaquetaria residual observada en los pacientes según los polimorfismos CYP2C19\*2 y CYP2C19\*17 se resume en la tabla 2. Tal como puede apreciarse, no hubo diferencias significativas entre los individuos silvestres y los polimórficos en cuanto a la reactividad plaquetaria residual inducida por ADP 5 y 10  $\mu$ M, medida con agregometría óptica. La agregación inducida por TRAP medida con agregometría óptica estuvo en la franja de normalidad descrita para sujetos sanos tanto en los pacientes de tipo silvestre como en los polimórficos (datos no presentados).

Por otro lado, los portadores del alelo CYP2C19\*2 \*/A presentaron una reactividad plaquetaria en el test de PRI-VASP superior a la de los pacientes de tipo silvestre (G/G) (el  $72,3 \pm 11,9\%$  frente al  $56,1 \pm 18,8\%$ ;  $p = 0,02$ ) (fig. 1A). De igual modo, se observó un PRI-VASP significativamente inferior en los portadores del alelo CYP2C19\*17 \*/T en comparación con los pacientes de tipo silvestre (C/C) (el  $51,3 \pm 17,8\%$  frente al  $63,8 \pm 18\%$ ;  $p = 0,048$ ) (fig. 1B).

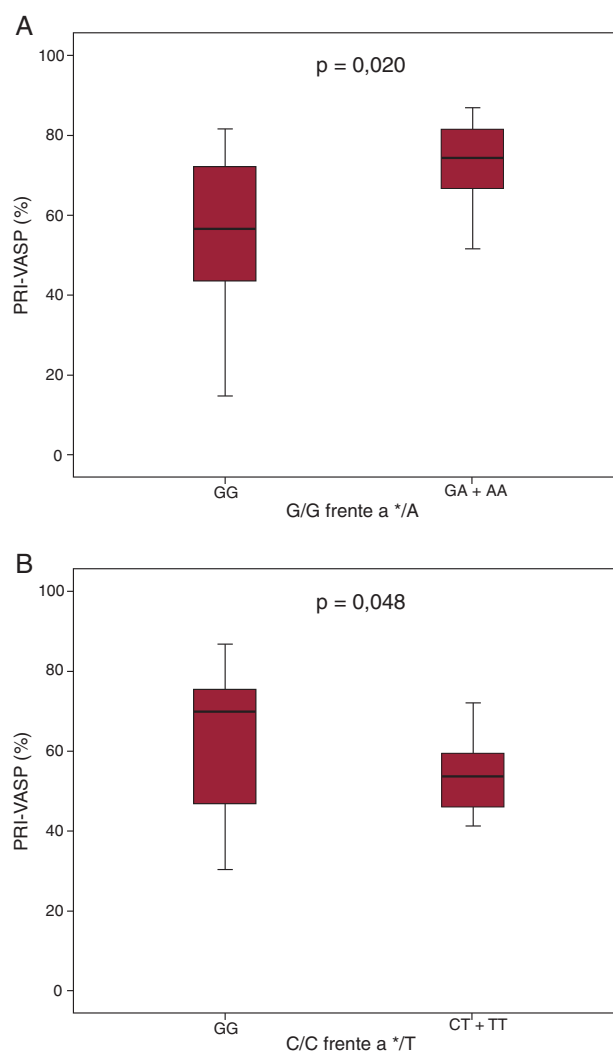
Analizamos a los pacientes con riesgo alto de trombosis según el punto de corte que se ha propuesto en un reciente consenso para la reactividad plaquetaria durante el tratamiento con clopidogrel en el contexto de la ICP<sup>12</sup>. En nuestra población, 26 (65%) y 29 (72,5%) pacientes presentaron una elevada reactividad plaquetaria residual, según las determinaciones realizadas con la agregación inducida por ADP y con el PRI-VASP, respectivamente. A pesar del bajo número de pacientes evaluados, los dos métodos utilizados para valorar la reactividad plaquetaria residual mostraron

**Tabla 2**Efecto del genotipo CYP2C19 en la agregación plaquetaria máxima inducida por adenosina difosfato durante el tratamiento con clopidogrel en pacientes con una intervención coronaria percutánea e implantación de *stent*

Polimorfismo	N	Agregación plaquetaria ADP 5 $\mu$ M	Agregación plaquetaria ADP 10 $\mu$ M
<b>CYP2C19*2</b>			
G/G	31	47,1 ± 14,3	54,2 ± 15,5
*/A	9	54,2 ± 12,5	62,6 ± 17,4
p		0,190	0,170
<b>CYP2C19*17</b>			
C/C	27	50,3 ± 14,6	58,1 ± 16,4
*/T	13	45,5 ± 12,8	51,9 ± 15,4
p		0,319	0,265

ADP: adenosina difosfato.

Los resultados se presentan como valores medios del porcentaje máximo de agregación, media ± desviación estándar.



**Figura 1.** Efecto del genotipo CYP2C19 en el test índice de reactividad plaquetaria-fosfoproteína estimulada por vasodilatadores en pacientes tratados con una intervención coronaria percutánea e implantación de *stent*. A: efecto de la variante alélica CYP2C19\*2. B: efecto de la variante alélica CYP2C19\*17. Los valores de fosforilación de fosfoproteína estimulada por vasodilatadores se evaluaron por citometría de flujo en sangre total citrada mediante un test comercial, tal como se describe en el apartado «Métodos». Los recuadros indican el intervalo intercuartílico. La línea continua corresponde a la mediana, y los límites inferior y superior indican los percentiles 2 y 98. PRI-VASP: índice de reactividad plaquetaria-fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.

**Tabla 3**

Efecto de los genotipos CYP2C19\*2 y CYP2C19\*17 en la prevalencia de pacientes de alto riesgo, según la elevada reactividad plaquetaria residual durante el tratamiento con clopidogrel

Polimorfismo		Pacientes, n (%)	LTA-ADP (5 $\mu$ M) $\geq$ 46%, n (%)	PRI-VASP $\geq$ 50%, n (%)
CYP2C19*2	CYP2C19*17			
<b>A</b>				
G/G	-	31 (77,5)	18 (58,1)	20 (64,5)
*A	-	9 (22,5)	8 (88,9)	9 (100)
p			0,091	0,036
-	C/C	27 (67,5)	20 (74,1)	22 (81,5)
-	*T	13 (32,5)	6 (46,2)	7 (53,9)
	p		0,084	0,074
<b>B</b>				
G/G	C/C	19 (47,5)	13 (68,4)	14 (73,7)
*A	C/C	8 (20)	7 (87,5)	8 (100)
G/G	*T	12 (30)	5 (41,7)	6 (50)
*A	*T	1 (2,5)	1 (100)	1 (100)
<b>Total</b>			26 (65)	29 (72,5)

LTA-ADP: agregación óptica máxima inducida con adenosina difosfato; PRI-VASP: índice de reactividad plaquetaria-fosfoproteína estimulada por vasodilatadores. Los efectos de cada alelo polimórfico en las pruebas de la función plaquetaria se han evaluado de dos formas: A, efecto individual de cada polimorfismo, y B, combinación de ambos polimorfismos.

Los datos se presentan como recuentos (porcentaje de casos). Se clasificó a los pacientes incluidos en el estudio del primer objetivo como «pacientes de alto riesgo» cuando la agregación máxima inducida por adenosina difosfato 5  $\mu$ M era  $\geq$  46% o cuando los valores de PRI-VASP eran  $\geq$  50% según los puntos de corte establecidos por Bonello et al<sup>12</sup> en un reciente consenso. Se comparó la prevalencia de pacientes de alto riesgo en portadores y no portadores de las variantes alélicas con la prueba de la  $\chi^2$ .

tendencia a una mayor representación de pacientes con aumento de la reactividad plaquetaria durante el empleo de clopidogrel en los portadores del alelo CYP2C19\*2 \*/A, mientras que el estado de portador del alelo CYP2C19\*17 \*/T mostró el efecto contrario (tabla 3).

### Segundo objetivo. Trascendencia pronóstica de los polimorfismos CYP2C19\*2 \*/A y \*17 \*/T

Debido a la interrupción temprana del tratamiento con clopidogrel en 65 de los casos incluidos, finalmente 428 pacientes

**Tabla 4**

Características basales de los pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST reclutados para el estudio del segundo objetivo según el genotipo CYP2C19

Variable	CYP2C19*2		CYP2C19*17		Total
	G/G	*/A	C/C	*/T	
<b>Pacientes, n (%)</b>	308 (72)	120 (28)	283 (66,1)	145 (33,9)	428 (100)
<b>Edad (años)</b>	67,3 $\pm$ 12	67,3 $\pm$ 12,8	67,3 $\pm$ 12,2	67,3 $\pm$ 12,2	67,3 $\pm$ 12,2
<b>Edad <math>\geq</math> 65 años (%)</b>	65,6	58,3	65	60,7	63,6
<b>Varones (%)</b>	64,3	66,7	66,4	62,1	65
<b>Hipertensión (%)</b>	68,1	75	68,8	72,4	70
<b>Dislipemia (%)</b>	55,2	53,3	54,8	54,5	54,7
<b>Diabetes mellitus (%)</b>	42,7	41,7	40,1	46,9	42,4
<b>Tabaquismo (%)</b>	22,4	21	23,4	19,3	22
<b>Al menos 3 FRCV (%)</b>	39,2	40	37,7	42,8	39,4
<b>Depresión del segmento ST (%)</b>	37,8	44,2	42,9	33,1	39,6
<b>Troponina T <math>\geq</math> 0,1 ng/ml (%)</b>	59,2	59,8	60,6	56,9	59,3
<b>Lesión significativa (%)</b>	30,2	31,3	29,9	31,7	30,5
<b>Síntomas de angina grave (%)</b>	29,4	37,4	29,2	36,4	31,6
<b>Puntuación TIMI</b>	3,2 $\pm$ 1,5	3,4 $\pm$ 1,6	3,2 $\pm$ 1,5	3,2 $\pm$ 1,6	3,2 $\pm$ 1,5
<b>Tratamiento durante la hospitalización</b>					
<i>Cateterismo</i>	71,3	75,2	75,7	66	72,4
Con stent	46	44,6	48,3	40,7	45,6
Sin stent	25,3	30,6	27,4	25,3	26,8
<i>Bypass arterial coronario</i>	10,1	14,4	11,7	10,4	11,2
<b>Tratamiento durante el periodo de seguimiento a 6 meses</b>					
<i>AAS</i>	96,4	95,8	95,4	97,9	96,3
<i>Clopidogrel</i>	100	100	100	100	100
<i>Bloqueadores beta</i>	86,8	90,9	90	83,3	87,9
<i>IECA</i>	55,3	50	56,9	46,9	53,7
<i>Nitratos</i>	28,1	39,6	36	21	31
<i>ARA-II</i>	14,2	22,7	18	13,5	16,6
<i>Antagonistas del calcio</i>	20,1	20,4	22,3	15,6	20,2
<i>Estatinas</i>	89,5	90,9	92	85,4	89,9

AAS: ácido acetilsalicílico; ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II; FRCV: factores de riesgo cardiovascular; IECA: inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina; lesión significativa: estenosis coronaria  $\geq$  50%.

Edad y puntuación TIMI se expresan como media  $\pm$  desviación estándar.



fueron recomendados por sus cardiólogos y se los evaluó en nuestro estudio. Las características demográficas y basales de estos 428 pacientes se detallan en la tabla 4. La media de edad fue  $67,3 \pm 12,2$  años; 278 (65%) eran varones y 150 (35%), mujeres. Respecto a la forma de presentación del SCASEST, el 39,6% de los pacientes incluidos presentaron depresión del segmento ST y el 59,3%, un aumento de los valores de troponina T (por encima del límite estándar). La media de puntuación de riesgo TIMI para el conjunto de la cohorte fue  $3,22 \pm 1,54$ . Las distribuciones genotípicas fueron las siguientes: el 71,96% G/G, el 24,77% G/A y el 3,27% A/A para el polimorfismo CYP2C19\*2, y el 66,12% C/C, el 30,14% C/T y el 3,74% T/T para el CYP2C19\*17. Para la distribución de los genotipos, no se observó ninguna desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0,527$  y  $p = 0,905$ , respectivamente). Así pues, hubo 120 pacientes portadores del alelo CYP2C19\*2 \*/A (28%) en nuestra población, y 145 portadores del alelo CYP2C19\*17 \*/T (33,9%) (tabla 4). Tal como se indica, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en las características demográficas y basales, la medicación y el manejo de los pacientes, independientemente del genotipo (tabla 4), con la excepción de las diferencias significativas en la depresión del segmento ST en los portadores del alelo CYP2C19\*17 ( $p = 0,05$ ), así como en la frecuencia de cateterismos (sin significación estadística en las tasas de implantación de stents) y de la prescripción de nitratos ( $p = 0,034$  y  $p = 0,037$ , respectivamente).

Se dispuso de datos completos de seguimiento a 6 meses en 412 (96,3%) de los 428 pacientes incluidos. De ellos, 97 (23,5%) presentaron eventos adversos en este periodo de seguimiento. El análisis univariable de la regresión de Cox (tabla 5), demostró que el estado de portador del alelo de pérdida de función CYP2C19\*2 (\*/A) no era un predictor significativo de evolución adversa ([HR (IC95%): 0,99 (0,64-1,55)],  $p = 0,984$ ). Tampoco el alelo de ganancia de función CYP2C19\*17 (\*/T) mostró significación estadística en la reducción de la frecuencia de los eventos adversos durante los 6 meses de seguimiento ([HR (IC95%): 0,75 (0,61-1,43)],  $p = 0,753$ ). Tal como se muestra en la figura 2, la supervivencia acumulada en este breve periodo de seguimiento no se vio significativamente influida por el genotipo CYP2C19, según el análisis univariable (tabla 5). En cambio, varios de los factores de riesgo utilizados para el cálculo de la puntuación de riesgo TIMI mostraron influencia estadísticamente significativa en los resultados clínicos en el

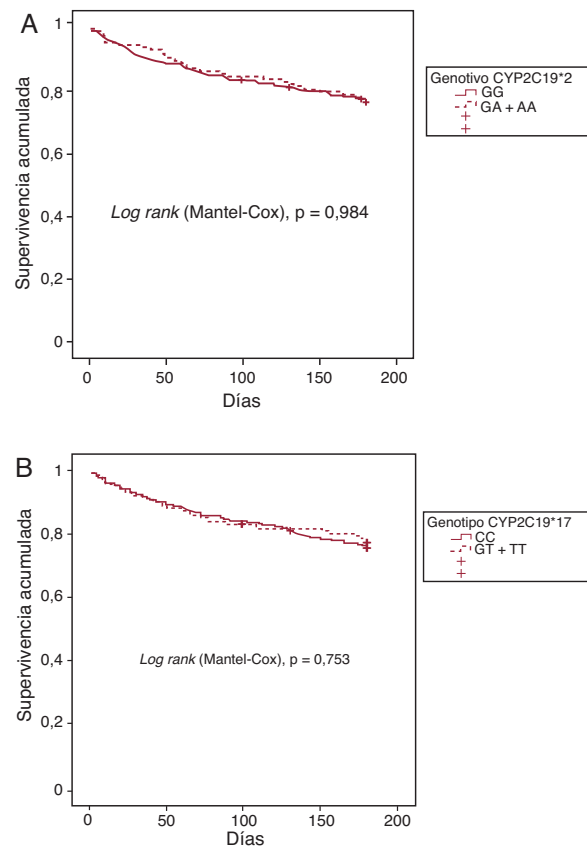
**Tabla 5**

Análisis de regresión de Cox para los eventos adversos (sí/no) en un seguimiento de 6 meses, según el genotipo y los factores de la puntuación de riesgo TIMI (segundo objetivo)

Variable	HR (IC95%)	p
<i>Análisis univariable</i>		
CYP2C19*2; */A frente a G/G	1 (0,94-1,55)	0,984
CYP2C19*17; */T frente a C/C	0,93 (0,61-1,43)	0,753
Sexo femenino	1,62 (1,09-2,42)	0,018
Edad $\geq 65$ años	2,45 (1,50-4,01)	< 0,001
Tres o más factores de riesgo cardiovascular	1,28 (0,86-1,91)	0,225
Estenosis coronaria $\geq 50\%$	1,40 (0,91-2,10)	0,132
Depresión del segmento ST	1,68 (1,13-2,51)	0,011
Ácido acetilsalicílico previo	1,40 (0,92-2,10)	0,113
Síntomas de angina grave	1,60 (1,04-2,50)	0,034
Troponina T $\geq 0,1$ ng/ml	1,34 (0,87-2,05)	0,182
Puntuación de riesgo TIMI	1,41 (1,23-1,62)	< 0,001
<i>Análisis multivariable</i>		
Sexo femenino	1,29 (0,82-2,02)	0,272
Edad $\geq 65$ años	2,52 (1,44-4,42)	0,001
Estenosis coronaria $\geq 50\%$	1,47 (0,88-2,46)	0,138
Depresión del segmento ST	1,63 (1,05-2,53)	0,028
Ácido acetilsalicílico previo	1,10 (0,66-1,82)	0,722
Síntomas de angina grave	1,56 (1-2,42)	0,051

HR: hazard ratio; IC95%: intervalo de confianza del 95%.

El grupo de referencia utilizado para calcular la interacción entre el alelo subyacente de \*2 y \*17 en el análisis univariable fue la variante del alelo de tipo silvestre.



**Figura 2.** Curvas de Kaplan-Meier para los portadores y no portadores de alelos CYP2C19 \*2 y \*17 con seguimiento de 6 meses. A: supervivencia acumulada para los portadores del alelo CYP2C19\*2 (GA + AA, línea discontinua) y los no portadores (GG, línea continua). B: supervivencia acumulada para los portadores del alelo CYP2C19\*17 (TC + TT, línea discontinua) y los no portadores (CC, línea continua).

análisis univariable; por ejemplo, la edad  $\geq 65$  años, las anomalías electrocardiográficas con depresión del segmento ST y los síntomas graves de angina (tabla 5). De hecho, la puntuación de riesgo TIMI resultó ser un potente predictor de la evolución clínica adversa en el conjunto de la población ([HR (IC95%): 1,41 (1,23-1,62)],  $p < 0,001$ ). Además, el sexo femenino mostró una asociación significativa con la evolución clínica adversa ([HR (IC95%): 1,62 (1,09-2,42)],  $p = 0,018$ ). No obstante, en el análisis multivariable, solamente la edad  $\geq 65$  años y las anomalías electrocardiográficas con depresión del segmento ST continuaron mostrando una asociación significativa con la evolución clínica adversa a los 6 meses de seguimiento ( $p = 0,001$  y  $p = 0,028$ , respectivamente) (tabla 5). Se demostró tendencia a una mala evolución clínica en relación con los síntomas graves de angina en las 24 h previas ( $p = 0,051$ ).

## DISCUSIÓN

Las discrepancias descritas en la reactividad plaquetaria durante el tratamiento con clopidogrel y el impacto de los polimorfismos CYP2C19\*2 y \*17 deben estar relacionados con el número de pacientes evaluados, pero también con el hecho de que la prueba de PRI-VASP evalúa específicamente la función del receptor P2Y<sub>12</sub> y parece ser más sensible para evaluar los efectos biológicos de clopidogrel según el estado del CYP2C19 (tabla 3), a diferencia de la agregación plaquetaria<sup>13</sup> inducida por ADP y

mediada por los receptores P2Y en la agregometría óptica. Además, la baja correlación entre las diversas pruebas de la función plaquetaria<sup>14,15</sup> parece variar en función de factores subyacentes que deben influir en la elevada reactividad plaquetaria residual<sup>16</sup>.

Muchos estudios han demostrado una asociación significativa del CYP2C19\*2 con un mal pronóstico clínico<sup>3,4,17</sup>. Nuestros datos sugieren que, en pacientes con riesgo trombotico moderado, ya que menos del 50% recibió ICP<sup>7,18</sup> e implantación de *stent*, la repercusión clínica de un único polimorfismo debe reducirse<sup>18</sup>. Otros estudios han demostrado que los eventos isquémicos y la trombosis de *stent* ocurren pronto tras el inicio del tratamiento con clopidogrel en asociación con la ICP y la implantación del *stent*<sup>3,4,18,19</sup>. Los pacientes a los que se practica una ICP deben mostrar un estado de reactividad plaquetaria diferente<sup>20</sup>. De hecho, muchos estudios han encontrado asociaciones positivas cuando se practicó ICP a más del 70% de los pacientes<sup>3-5,19</sup>, independientemente del pequeño tamaño muestral<sup>2,19</sup>. Por el contrario, para porcentajes de ICP menores (el 18% ICP, el 15,5% con *stents*), el análisis genético del test *Clopidogrel in Unstable Angina to prevent Recurrent Events* (CURE)<sup>7</sup> no encontró asociación significativa entre la presencia de alelos polimórficos CYP2C19\*2 (\*2/\*2, \*2/\*3 y \*3/\*3) y la ocurrencia de eventos adversos.

La diabetes mellitus se ha asociado con hiperreactividad plaquetaria y, junto con el polimorfismo CYP2C19\*2, es el mejor factor discriminador para explicar la respuesta insuficiente a clopidogrel<sup>21</sup>. No obstante, los resultados de un reciente metaanálisis, en el que el 91% de los pacientes habían sido tratados con ICP, indican que el impacto de la presencia del alelo CYP2C19\*2 se asocia a un riesgo elevado de un resultado clínico adverso, en mayor medida que otros factores clínicos<sup>5</sup>. En consonancia con estos resultados, la diabetes mellitus fue más frecuente (42,4%) en nuestra población que en otras (23-28%)<sup>5,18</sup>. Sin embargo, en nuestra población, la mayor prevalencia de diabetes mellitus no parece ser suficiente para elevar significativamente el riesgo de los portadores del alelo \*2, a pesar de que se combine con una frecuencia de ICP cercana al 70% y una tasa de implante de *stent* de casi un 50%. Así pues, la ICP y la implantación de *stents*, más que otras condiciones clínicas, deben considerarse factores de alto riesgo trombotico en pacientes portadores del alelo CYP2C19\*2 \*/A doblemente antiagregados. En consecuencia, debemos ser muy cautos al definir «poblaciones de alto riesgo» dependiendo del escenario clínico subyacente. Aun así, el estado del alelo CYP2C19\*2 sólo explica un 5-15,2% de la heterogeneidad de respuesta al clopidogrel<sup>2</sup>.

Por otro lado, la trascendencia clínica del estado de portador del CYP2C19\*17 todavía está por esclarecer. Algunos estudios han relacionado este polimorfismo con una mayor respuesta al clopidogrel<sup>7</sup> y un incremento del riesgo hemorrágico<sup>18,22</sup>. Hay poco consenso acerca de un posible efecto neutro<sup>6</sup> o protector respecto a la ocurrencia de eventos isquémicos<sup>22,23</sup>. Nuestros resultados no indican una interacción significativa entre el estado del alelo \*17 y los eventos adversos, a pesar de que se registraron tasas más bajas de cateterismo en los portadores del alelo \*17 que en los no portadores (el 66 frente al 75,7%;  $p=0,034$ ), probablemente debido al riesgo moderado de nuestra población. Los estudios con resultados positivos que asocian el polimorfismo CYP2C19\*17 con una reducción en la tasa de eventos adversos se basan en un número bajo de pacientes tratados con ICP (18%)<sup>7</sup> e implantación de *stent* (15,5%). No obstante, las tasas más altas de ICP (90-100%) se asocian a ausencia de reducción de los eventos isquémicos, independientemente del estado del alelo CYP2C19\*17<sup>4,6</sup>. El test PLATO podría ser comparable al nuestro, dada la frecuencia de ICP (66%), pero sólo aporta información acerca de la asociación entre el alelo \*17 y el riesgo hemorrágico<sup>18</sup>. Así pues, en pacientes con un riesgo trombotico moderado o mayor, el efecto clínico «protector» del CYP2C19\*17 debe ser

inferior. Lamentablemente, no registramos las tasas de hemorragia en nuestros pacientes para explorar la influencia de estos polimorfismos en las posibles complicaciones hemorrágicas<sup>4,6,7,18</sup> en nuestra cohorte.

La elevada variabilidad interindividual de respuesta al clopidogrel continúa siendo una cuestión clínicamente relevante<sup>24-27</sup>. A pesar de que se ha demostrado que esta heterogeneidad es un proceso multifactorial<sup>24,25,28,29</sup>, diversos estudios han señalado la existencia de una relación entre el genotipo CYP2C19 y las consecuencias pronósticas<sup>30-32</sup>. Sin embargo, el sexo femenino (35%) se ha asociado a eventos adversos, según los resultados de Mega et al<sup>5</sup>. La trascendencia pronóstica individual debe depender del contexto clínico<sup>21,33</sup>. Las características demográficas y basales, junto con el estado del CYP2C19<sup>19,21,33,34</sup>, en nuestra cohorte (el 42,2% diabetes, el 35% sexo femenino y el 45,6% implantación de *stents*) pueden explicar, al menos en parte, la tendencia (aunque sin significación estadística) de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. El fenotipo es el resultado de la combinación del genotipo y el ambiente donde se expresa, lo que debe ser la variable más importante en la enfermedad cardiovascular<sup>21,33</sup>.

## Limitaciones

En primer lugar, observamos una gran incidencia de elevada reactividad plaquetaria residual en los pacientes estudiados para el primer objetivo, y ello puede ser una limitación para alcanzar diferencias significativas en función del genotipo en las pruebas de función plaquetaria por agregometría óptica. No encontramos una explicación clara para estos resultados. Sin embargo, una tasa más elevada de uso de *stents* farmacoadictivos, relacionada con una cicatrización de la neointima defectuosa en las arterias coronarias, puede estar relacionada con una mayor reactividad plaquetaria.

En segundo lugar, el tamaño muestral de ambas poblaciones fue pequeño y se basó en el número máximo de pacientes que aceptaron participar. No podemos descartar que la potencia estadística fuera insuficiente, como ha ocurrido en estudios previos<sup>18</sup>. La prevalencia alélica fue muy similar a la de otros estudios<sup>3-7</sup>, con el 3,3 y el 3,7% de A/A (CYP2C19\*2) y T/T (CYP2C19\*17), respectivamente. Además, evaluamos poblaciones enteramente caucásicas; por consiguiente, nuestros resultados deben ser específicos para nuestras poblaciones de pacientes y la forma en que los tratamos. Por consiguiente, nuestro estudio podría subestimar la influencia de los polimorfismos genéticos en los efectos de clopidogrel en nuestro contexto específico. Además, la mayoría de los estudios en que se ha evaluado el impacto del CYP2C19 han tenido periodos de seguimiento más largos; nosotros realizamos un seguimiento relativamente corto, de 6 meses, similar al de un estudio previo<sup>5</sup>.

Estudiamos tan sólo los dos polimorfismos más comúnmente asociados con la evolución clínica; sin embargo, hay otros alelos o factores basales/demográficos que pueden ser relevantes para cada caso particular. Otra limitación en el segundo objetivo es el breve periodo de seguimiento. El hecho de que no se evaluara el cumplimiento de la terapia con clopidogrel en la población del segundo objetivo también puede ser una limitación. Por último, el empleo de dos poblaciones diferentes impide establecer asociaciones entre la reactividad plaquetaria durante el tratamiento, los eventos cardiovasculares y el estado de portador del alelo CYP2C19.

## CONCLUSIONES

Las variantes alélicas CYP2C19\*2 \*/A y CYP2C19\*17 \*/T se asocian significativamente a un aumento y una disminución,

respectivamente, de la reactividad plaquetaria durante el tratamiento con clopidogrel, al evaluar el efecto específico de este fármaco en el P2Y<sub>12</sub>.

Sin embargo, el estado de portador del CYP2C19 ha mostrado una influencia poco consistente en los eventos adversos en pacientes con SCASEST no seleccionados de riesgo moderado en un periodo de seguimiento de 6 meses. Estas poblaciones deben estar más influidas por otros factores clínicos/demográficos. Debe haber un beneficio diferente asociado al tratamiento con clopidogrel en la prevención de eventos adversos tales como la trombosis del *stent* y la recurrencia del síndrome coronario agudo. La trombosis arterial podría verse influida por multitud de variables. Los resultados obtenidos mediante un determinado test deben interpretarse con precaución en función de los diferentes contextos clínicos.

## FINANCIACIÓN

Este estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (RECAVA RD 06/0014-0039), la Fundación Séneca (07703/GERM/07), y la Beca Fundación Uriach-Sociedad Española de Cardiología 2009.

## CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

## BIBLIOGRAFÍA

- Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos.* 2010;38:92-9.
- Bouman HJ, Harmsze AM, Van Werkum JW, Breet NJ, Bergmeijer TO, Ten Cate H, et al. Variability in on-treatment platelet reactivity explained by CYP2C19\*2 genotype is modest in clopidogrel pretreated patients undergoing coronary stenting. *Heart.* 2011;97:1239-44.
- Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, et al. French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009;360:363-75.
- Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009;360:354-62.
- Mega JL, Simon T, Collet JP, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA.* 2010;304:1821-30.
- Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation.* 2010;121:481-3.
- Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med.* 2010;363:1704-14.
- Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey Jr DE, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction). *Circulation.* 2007;116:e148-304.
- Antman EM, Cohen M, Bernink PJ, McCabe CH, Horacek T, Papuchis G, et al. The TIMI risk score for unstable angina/non-ST elevation MI: A method for prognostication and therapeutic decision making. *JAMA.* 2000;284:835-42.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica.* 2007;92:694-7.
- Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost.* 2005;3:85-92.
- Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al.; Working Group on High On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:919-33.
- Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica.* 2009;94:700-11.
- Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol.* 2009;103 Suppl 3:A20-6.
- Price MJ, Barker CM. Functional testing methods for the antiplatelet effect of P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists. *Biomark Med.* 2011;5:43-51.
- Riviera J, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. The influencing factors for clopidogrel-mediated platelet inhibition are assay-dependent. *Thromb Res.* 2011 May 26 [Epub ahead of print].
- Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet.* 2010;376:1312-9.
- Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, et al.; PLATO investigators. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet.* 2010;376:1320-8.
- Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA.* 2009;302:849-57.
- Braunwald E, Angiolillo D, Bates E, Berger PB, Bhatt D, Cannon CP, et al. The problem of persistent platelet activation in acute coronary syndromes and following percutaneous coronary intervention. *Clin Cardiol.* 2008;31 (3 Suppl 1):17-20.
- Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, Valina CM, Stratz C, Bestehorn HP, et al. 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. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2427-34.
- Ferreiro JL, Sibbing D, Angiolillo DJ. Platelet function testing and risk of bleeding complications. *Thromb Haemost.* 2010;103:1128-35.
- Tiroch KA, Sibbing D, Koch W, Roosen-Runge T, Mehilli J, Schömig A, et al. Protective effect of the CYP2C19\*17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am Heart J.* 2010;160:506-12.
- Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Clopidogrel response variability: current status and future directions. *Thromb Haemost.* 2009;102:7-14.
- Angiolillo DJ, Ferreiro JL. Inhibición del receptor plaquetario P2Y<sub>12</sub> de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63:60-76.
- Bonello L, Armero S, Ait Mokhtar O, Mancini J, Aldebert P, Saut N, et al. Clopidogrel loading dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients carrying the 2C19\*2 loss of function polymorphism. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:1630-6.
- Anderson CD, Biffi A, Greenberg SM, Rosand J. Personalized approaches to clopidogrel therapy: are we there yet? *Stroke.* 2010;41:2997-3002.
- Angiolillo DJ. Variability in responsiveness to oral antiplatelet therapy. *Am J Cardiol.* 2009;103 Suppl 3:A27-34.
- Múñoz C, Jover E, Hernández-Romero D, Saura D, Valdés M, Lip GYH, et al. Interactions between clopidogrel and proton pump inhibitors: a review of evidence. *Curr Med Chem.* 2011;18:2386-400.
- Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood.* 2006;108:2244-7.
- Fontana P, Hulot JS, De MP, Gaussem P. Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost.* 2007;5:2153-5.
- Frere C, Cuisset T, Morange PE, Quilici J, Camoin-Jau L, Saut N, et al. Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 2008;101:1088-93.
- Geisler T, Bigalke B, Schwab M. CYP2C19 genotype and outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med.* 2011;364:481-2.
- Ueno M, Ferreiro JL, Tomasello SD, Capodanno D, Tello-Montoliu A, Kodali M, et al. Functional profile of the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor signalling pathway in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2011;105:730-2.