



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Medicina
 Maestría Ciencias en Biomedicina



“Evaluación del efecto de los polimorfismos rs6809699, rs6785930 y rs2046934 en el receptor plaquetario P2Y12 sobre la dinámica de agregación en pacientes con enfermedad coronaria bajo tratamiento antiplaquetario”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

Médico General Leslie Marisol Lugo Gavidia

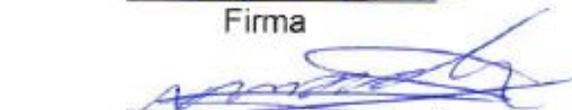
Dirigido por:

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz

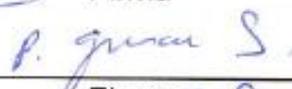
Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
 Presidente


 Firma

Dr. Marco Antonio Alcocer Gamba
 Secretario


 Firma

Dr. Pablo García Solís
 Vocal


 Firma

Dr. Nicolás Camacho Calderón
 Suplente


 Firma

Dra. Haydé A. Castañeda Vergara
 Suplente


 Firma

Dr. Javier Ávila Morales
 Director de la Facultad


 Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca
 Director de Investigación y Posgrado

Universidad Autónoma de Querétaro
 Querétaro, Qro. México
 Octubre 2017

RESUMEN

La plaqueta tiene un papel central en la iniciación, propagación y recurrencia del trombo dentro de los síndromes coronarios agudos y constituye la base para el empleo de agentes antiplaquetarios. Se ha descrito la influencia de polimorfismos genéticos del receptor P2Y12 en la respuesta a la activación plaquetaria entre los polimorfismos implicados se encuentran rs6809699, rs6785930 y rs2046934.

El objetivo de este trabajo fue determinar la agregación plaquetaria en presencia de los SNP rs6809699, rs6785930 y rs2046934 en el receptor plaquetario P2Y12.

Se analizaron 43 pacientes con enfermedad coronaria aguda bajo tratamiento antiplaquetario dual.

Se determinó la agregación plaquetaria mediante el sistema VerifyNow la cual se cuantificó en unidades de reactividad plaquetaria (PRU) así como porcentaje de inhibición con fármaco antiplaquetario. La agregación plaquetaria fue de 31.8 ± 29.9 PRU (promedio \pm SD), con un porcentaje de inhibición de $81.9 \pm 17\%$ (promedio \pm SD). Se determinó la presencia de los polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) rs6809699, rs6785930 y rs2046934 de 34 mediante PCR tiempo real utilizando TaqMan genotyping master mix. La frecuencia alélica para el alelo de alto riesgo fue: A) rs6809699: 14.5% B) rs6785930: 27.9% y C) rs2046934: 14.7%.

Se compararon los valores de agregación plaquetaria en relación al genotipo presentado. Los pacientes heterocigotos mostraron mayor reactividad plaquetaria comparada con los homocigotos para el alelo ancestral. Los pacientes con presencia de dos o más alelos de alto riesgo muestran una tendencia numérica a mayor agregación plaquetaria.

Palabras clave: receptor P2Y12, agregación plaquetaria, polimorfismos de nucleótido sencillo

Contenido

RESUMEN	2
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ANTECEDENTES	7
ENFERMEDAD CORONARIA	7
FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME CORONARIO AGUDO	7
DINÁMICA/FUNCIÓN PLAQUETARIA	9
FISIOLOGÍA PLAQUETARIA	9
PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS..	13
POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (SNP)	20
EFECTO DE LOS SNP EN EL RECEPTOR P2Y12	21
TERAPIA ANTIPLAQUETARIA	24
INHIBIDORES RECEPTOR P2Y12	25
1. CLOPIDOGREL	25
2. PRASUGREL	26
3. TICAGRELOR	27
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
DISEÑO	30
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	30
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	30
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	30
PRUEBAS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA.....	30
DETERMINACIÓN DE LOS SNP rs6809699, rs6785930 y rs2046934	31
RESULTADOS.....	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA.....	33
RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA.....	40

DISCUSIÓN	44
CONCLUSIÓN	49
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO 1.....	58
CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	58
FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	61
ANEXO 2.....	64
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DNA	64

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. FRECUENCIA ALÉLICAS REPORTADAS PARA POLIMORFISMOS RS6809699 Y RS6785930. MODIFICADO DE VARGAS ET AL., 2014.	22
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE DIFERENTES ANTIPLAQUETARIOS. MODIFICADO DE FRANCHI ET AL., 2014.....	25
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS 43 PACIENTES INCLUIDOS.....	33
TABLA 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO VARIABLES CUANTITATIVAS PRUEBAS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA.....	34
TABLA 5. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS PARA RS6809699, RS6785930 Y RS2046934.....	40
TABLA 6. COMPARACIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA Y LA PRESENCIA DE LOS SNP. SE UTILIZÓ PRUEBA ESTADÍSTICA KRUSKAL WALLIS. ...	41
TABLA 7.COMPARACIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA Y GENOTIPO DE POLIMORFISMOS (MODELO LINEAL GENERAL).....	42
TABLA 8. COMPARACIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN RELACIÓN AL NÚMERO DE SNP PRESENTADOS	43
TABLA 9. COMPARACIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN RELACIÓN AL NÚMERO DE SNP PRESENTADOS.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 . VÍAS DE ACTIVACIÓN DE LA PLAQUETA Y RECEPTORES IMPLICADOS.	10
FIGURA 2. MECANISMOS INTRACELULARES DE RESPUESTAS A AGONISTAS	17
FIGURA 3. MECANISMO DE FORMACIÓN DE TROMBO EN ENFERMEDAD CORONARIA.	18
FIGURA 4. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR P2Y12.....	22
FIGURA 5. UNIDADES DE REACTIVIDAD P2Y12R (PRU).	34
FIGURA 6. HISTOGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE PRU. ...	35
FIGURA 7. COMPARACIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA ENTRE GÉNERO.....	35
FIGURA 8. AGREGACIÓN PLAQUETARIA E IMC.....	36
FIGURA 9. AGREGACIÓN PLAQUETARIA Y EDAD.	36
FIGURA 10 AGREGACIÓN PLAQUETARIA Y TFG.....	37
FIGURA 11. COMPARACIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN POBLACIONES DE RIESGO.....	37
FIGURA 12. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN LINEAL DE PEARSON DE FACTORES DE RIESGO METABÓLICOS CARDIOVASCULARES.	38
FIGURA 13. COMPARACIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN RELACIÓN DE VALORES EN META DE FACTORES DE RIESGO METABÓLICOS.	39
FIGURA 14. SCORES DE VALORACIÓN CLÍNICA.	40
FIGURA 15. COMPARACIÓN AGREGACION PLAQUETARIA Y GENOTIPO PRESENTADO.	41
FIGURA 16. DELTA DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE PRU BASALES A PRU CON INHIBICIÓN DEL FÁRMACO PARA CADA GENOTIPO.	42
FIGURA 17. COMPARACIÓN AGREGACION PLAQUETARIA EN RELACIÓN A PRESENCIA DE ALELO DE ALTO RIESGO.....	43
FIGURA 18. COMPARACIÓN DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN RELACIÓN AL NÚMERO DE SNP.....	44

ANTECEDENTES

ENFERMEDAD CORONARIA

La enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de muerte en todo el mundo, es responsable del 29% del total de muertes en el mundo; aproximadamente 16,7 millones de muertes al año (Ford et al., 2009; Yeh et al., 2010; Go et al., 2014). En nuestro país, el infarto agudo del miocardio (IAM) es la primera causa de muerte. La mortalidad reportada en México es de 27.2% a un mes de su diagnóstico, 3 veces más elevada que la reportada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (7.9%). La aterosclerosis coronaria en general puede ser asintomática durante varias décadas. La transición desde asintomática a sintomática se relaciona con trombo coronario agudo (aterotrombosis). Esta condición se inicia principalmente por una ruptura de la placa o la erosión, lo que desencadena una serie de eventos bioquímicos que terminan en la formación del trombo que lleva al evento agudo (Fuster et al., 2005; Moreno et al., 2009).

FISIOPATOLOGÍA DEL SINDROME CORONARIO AGUDO

El desarrollo de la placa aterosclerosa implicada en la enfermedad coronaria se lleva a cabo en años o décadas. Antes se consideraba a la placa aterosclerosa solo como un almacén de lípidos; ahora entendemos que existe una interacción compleja de los diferentes factores de riesgo que provocan alteraciones en las células de la pared arterial (Libby., 2002), y liberación de productos derivados de un proceso de inflamación local y sistémico que favorece la liberación de citocinas y otros mensajeros a nivel molecular que al final llevan al desarrollo de una lesión obstructiva (Libby., 2002). La placa está compuesta de una matriz que tiene una cubierta celular. El desarrollo de la matriz está relacionado con diversos factores de riesgo como diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, dislipidemia, tabaquismo y sobrepeso (Lanas et al., 2007). En la génesis de la placa, el paciente con resistencia a la insulina y diabetes tiene mayor grado de disfunción

endotelial; en los diabéticos durante los periodos de hiperglucemia los productos de la glucooxidación de moléculas penetran a través de las uniones de las células endoteliales y llegan al espacio subendotelial (Bonfeldt et al., 2011). Estos productos glucooxidados pueden ser moléculas de colesterol de baja densidad (C-LDL) que en este estado son aún más aterogénicas. Cuando hay exceso de tejido adiposo corporal, sobre todo visceral, se lleva a cabo la liberación de citocinas que promueven aumento en las moléculas de adhesión endotelial y factor de necrosis tumoral como la Leptina. Durante el síndrome coronario agudo hay disminución de la adiponectina, molécula protectora secretada por el tejido adiposo que inhibe la expresión de las moléculas de adhesión, traslado de leucocitos en el endotelio y disminución del factor de necrosis tumoral, con esto ejerce un efecto protector (Grundy., 2004). Con la relación desfavorable de aumento en la leptina y disminución de la adiponectina se favorece mayor unión y paso al espacio subendotelial de las células blancas de la sangre, sobre todo monocitos, que una vez en éste sitio se convierten en macrófagos e intentarán eliminar los productos oxidados y glucooxidados. En el interior de los macrófagos se produce una activación de vesículas que liberan citocinas que interactúan con células de músculo liso de la capa media de la arteria, y con las células endoteliales, promoviendo la proliferación de ambas y la migración de las primeras hacia la capa que cubre la matriz. En este espacio hay liberación de diferentes enzimas como proteoglicanos, metaloproteinasas y otras, que atrapan las moléculas oxidadas reteniéndolas por más tiempo, lo cual permite que se continúe el estímulo para la llegada de más monocitos y formación de macrófagos que sufrirán el mismo proceso degenerativo, y posterior destrucción, creando con ello un círculo vicioso. Esto cobra mayor importancia en los paciente con síndrome coronario agudo en donde se encuentra una mayor concentración de éstas células en comparación con paciente con angina estable (Moreno et al., 1996).

En un intento de la arteria de encapsular la matriz de la lesión aterosclerosa o centro necrótico, se promueve la migración de células y se estimula el desarrollo de las células musculares y endoteliales que forman una capa cada vez más

gruesa y rígida, que incluye el proceso de calcificación de la pared y con ello evitan la ruptura de la placa.

En presencia de una placa aterosclerosa aumenta el grosor de la pared arterial, con ello disminuye el diámetro del lumen del vaso, con la consiguiente disminución en el flujo de sangre; éste fenómeno hemodinámico está provocado por la estenosis del vaso. Sin embargo, hay un proceso de remodelación vascular que permite mantener un mayor diámetro luminal al aumentar el diámetro externo del vaso y con ello aumentar el grosor de la pared sin afectar el lumen y conservando el flujo sanguíneo. Esto fue descrito por Glagov et al. (1987), y se pensó que constituía sólo un fenómeno anatómico, donde llegando al punto de “falla vascular” iniciaría la estenosis luminal. Sin embargo, se han encontrado factores que favorecen el remodelado vascular en diversas situaciones, incluyendo pacientes con hipertensión y post angioplastia. Ocurre un cambio en el estrés vascular por cizallamiento del flujo sanguíneo que favorece el aumento en la remodelación y la expresión de diversas sustancias como interleucinas (IL-18) y metaloproteinasas (MMP-9), que una vez expresadas, el segmento arterial con lesión aterosclerótica, llegará al punto de “falla vascular” e iniciará la expresión clínica de la estenosis vascular. Generalmente esto se representa cuando la disminución del diámetro luminal sobrepasa el 50% (Vyacheslav et al., 2007).

DINÁMICA/FUNCIÓN PLAQUETARIA

FISIOLOGÍA PLAQUETARIA

Las plaquetas intervienen en el proceso trombótico agudo que sigue a la rotura de la placa de ateroma. Algunos datos experimentales también indican la posible participación de las plaquetas en la formación de la placa ateromatosa.

Las plaquetas son células enucleadas de 1-2 μm de tamaño, generadas en la médula ósea por fragmentación de los bordes de los megacariocitos. Normalmente se producen alrededor de 1×10^{11} plaquetas/día. La expectativa de vida de las plaquetas es de 7 a 10 días, que se acumulan en el lugar donde el

endotelio está disfuncional o dañado dentro de la pared arterial, lo que inicia la formación del trombo (Bizzozero., 1985).

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma no activa y expresan en su superficie un número relativamente pequeño de muchas de las moléculas que, en estado activado, van a facilitar su interacción con otras plaquetas y otras células de su entorno (**Figura 1**).

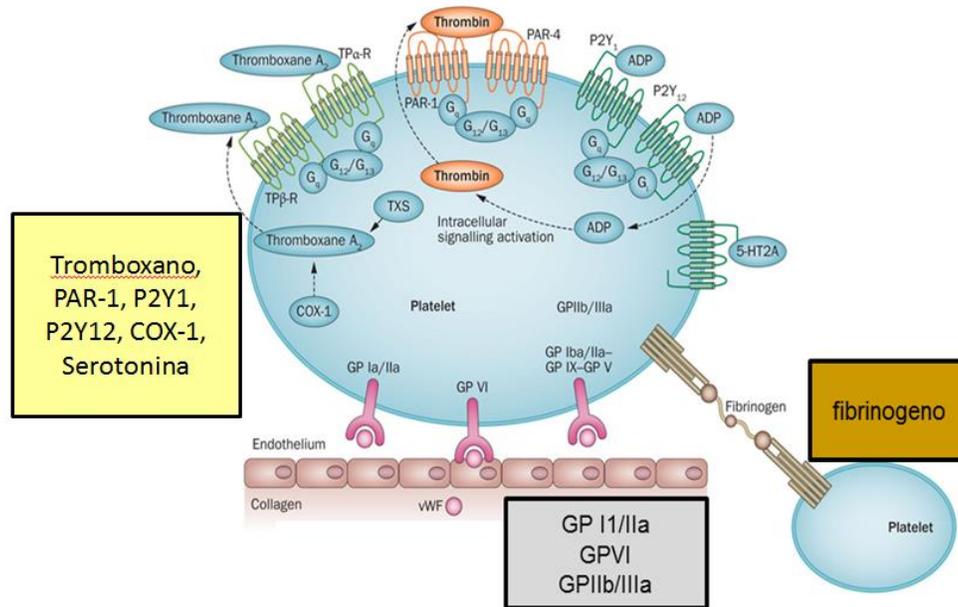


Figura 1 . Vías de activación de la plaqueta y receptores implicados.

Se observan los diferentes receptores implicados en diferentes partes de la fisiología plaquetaria: activación, adhesión y agregación. Modificado de Angiolillo et al., 2010.

A continuación se enlistan los principales receptores implicados en la respuesta de agregación plaquetaria:

Receptores de ADP: el ADP juega un papel central en la hemostasia al actuar como cofactor esencial de la activación plaquetaria. El ADP está presente en altas concentraciones en los gránulos densos y se libera por activación plaquetaria y ejerce un reforzamiento para la agregación plaquetaria (Mills., 1996).

Receptores de epinefrina: Esta es mediada por receptores α 2-adrenérgicos, estos no provocan cambio conformacional (Ware et al., 1995).

Receptores de serotonina: Las plaquetas activas liberan serotonina de los gránulos densos, lo que amplifica la respuesta plaquetaria a través de receptores específicos 5-HT_{2A} (Glennon et al., 1997).

Receptores de tromboxano A₂: estimulan el cambio de forma, el reclutamiento y agregación plaquetaria.

Receptores de vasopresina: la vasopresina induce cambios de forma, secreción de los gránulos y agregación de las plaquetas.

Receptor del factor activador de plaquetas (FAP): Este agonista se sintetiza por varias células inflamatorias y las propias plaquetas e induce cambios de forma, secreción y agregación (Shukla., 1999).

Receptores de trombina: la trombina es uno de los más potentes activadores de plaquetas.

Receptores de colágena: varias proteínas de la membrana plaquetaria participan en la activación y adhesión que induce la colágena: GP Ia-IIa, GP IV, GP VI y GP V (Clemeston et al., 2001).

Receptores para la adhesión plaquetaria: la participación de las glucoproteínas (GP) de la superficie de la membrana es crítica para la adhesión de las plaquetas al subendotelio expuesto (colágena, fibronectina y factor de von Willebrand) y para la interacción con otras plaquetas y componentes de la sangre (fibrinógeno y factor de von Willebrand). Se enumeran de la I a la IX (Bennet et al., 1990). Pertenecen a la familia de las integrinas. La glucoproteína más abundante es la IIb/IIIa (α IIb/ β 3), que es la responsable de la unión al fibrinógeno, colágena, protrombina, factor de von Willebrand, trombospondina y vitronectina, y principal promotor de la agregación plaquetaria (Nierodzki et al., 1994).

Además, las plaquetas contienen en su citoplasma diferentes factores activos:

1. **Moléculas de actina y miosina**
2. **Residuos de retículo endoplásmico y aparato de Golgi,** sintetizan diversas enzimas y almacenan grandes cantidades de iones de calcio.
3. **Sistemas enzimáticos** capaces de formar prostaglandinas, ATP y ADP
4. **Factores de crecimiento**

5. **Gránulos densos** La liberación de estos ocurre por exocitosis, y desde ellos se liberan adenosin difosfato (ADP), adenosin trifosfato (ATP), fosfato inorgánico, polifosfatos, serotonina y calcio. La liberación de ADP es esencial como cofactor de la agregación plaquetaria y actúa mediante su interacción con receptores específicos localizados en la superficie plaquetaria. Se conocen dos receptores para el ADP en la plaqueta, uno acoplado a la proteína Gq (el P2Y1) y otro acoplado a Gi (el P2Y12), que es esencial para la hemostasia primaria (Kahner et al., 2006; Angiolillo., 2010). El P2Y1 es lo que origina la activación inicial reversible, mientras que el P2Y12 es necesario para la activación prolongada y la agregación plaquetaria. El calcio liberado por la plaqueta es necesario para la formación de fibrina, mientras que los polifosfatos actúan como elementos reguladores en la coagulación y en el sistema fibrinolítico reaccionando con el factor XII (Caen et al., 2010), entre otros. Finalmente, la serotonina no sólo tiene efecto vasoconstrictor, sino que también interviene en la activación de las propias plaquetas.
6. **Lisosomas plaquetarios** contienen elastasas y otras proteasas que facilitan la degradación de la matriz extracelular, además de crear un ambiente ácido que favorecerá la acción de estas enzimas.
7. **Los gránulos α** : son reservorios de proteínas (GP IIb/IIIa, P-selectina, factor de crecimiento de plaquetas (PDGF), leucocitos, células endoteliales y citosinas)

Los mecanismos de activación y agregación plaquetaria son múltiples y complejos. La unión de los receptores de la superficie de las plaquetas a sus ligandos activa varias reacciones bioquímicas en cascadas de señalización intracelular a través de segundos mensajeros, (tirosincinasas, calcio, la fosfolipasa C, el fosfoinositol 3 cinasa y el AMP cíclico) (Gibbins., 2004). Esta señalización produce cuatro cambios mayores en las plaquetas:

- Rearreglo del citoesqueleto de actina causa aplanamiento de las plaquetas y extensión de pseudópodos (filópodos y lamelópodos) para sellar el defecto endotelial (Hartwing., 2006)

- Activación de la fosfolipasa A2 libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y se convierte en prostaglandinas y tromboxano A2 (TXA) (Johnson., 1999), que, además, aumenta la vasoconstricción e inducen un taponamiento local
- Los gránulos intracelulares se unen con el sistema canalicular abierto de la membrana y liberan su contenido en el plasma circundante. Los gránulos densos liberan ADP y serotonina, que interactúan con los receptores celulares de superficie de otras plaquetas, amplificando la activación y estimulando la agregación (Gachet., 2001).
- Activación plaquetaria conduce a un incremento en la concentración de GP IIb/IIIa en la membrana e induce cambios en su conformación, lo que permite su unión a fibrinógeno soluble y agregación de las plaquetas (Nierodzki., 1994) También se efectúa la activación plaquetaria por la trombina y la epinefrina circulantes, cuyos efectos se realizan a través de receptores específicos.

El mecanismo de formación del trombo plaquetario puede dividirse en cuatro etapas:

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
4. Estabilización del trombo

PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS

El mecanismo fisiopatológico común de los síndromes coronarios agudos (SCA) es la rotura o erosión de una placa aterosclerótica con consiguiente trombosis intracoronaria (aterotrombosis). El papel central de la plaqueta en la iniciación, propagación y recurrencia del trombo constituye la base para el empleo de agentes antiplaquetarios en la totalidad de los pacientes con SCA. La aterosclerosis representa además, un sustrato idóneo para la trombogénesis, ya

que a la pérdida de las propiedades antitrombóticas del endotelio se sumaría un mayor potencial trombogénico que favorece la generación de trombina y el depósito de fibrina; de ahí el papel clave de los fármacos antitrombóticos. La trombosis va a suponer, además, un estímulo adicional para el crecimiento de la placa de ateroma (Paramo et al., 2007).

Cuando hay solución de continuidad en la pared endotelial y disrupción de placa aterosclerosa, se favorece la activación de la hemostasia, el vaso sanguíneo expone hacia el interior de la luz vascular colágeno subendotelial donde las plaquetas se unen mediante su receptor GPIIb/IIIa que actúa en la fase inicial de frenado de las plaquetas sobre la pared vascular (Davi et al., 2007, Andrews et al., 2004).

Dicha unión entre las plaquetas y colágeno subendotelial se refuerza mediante el FvW mediante la interacción del dominio A1 del FvW con GPIIb/IIIa, así mismo este es también el receptor más conocido de la proteína Mac-1, localizada en la superficie de los leucocitos activados. Mediante la interacción entre GPIIb/IIIa y Mac-1 ocurre la unión entre plaqueta y leucocito, importante en respuesta inflamatoria mediada por plaquetas.

La interacción transitoria entre el FvW y la GPIIb/IIIa permite la «rodadura» de las plaquetas en la zona dañada del vaso. Como resultado, las proteínas contenidas en la pared vascular, fundamentalmente el colágeno, inducirán la activación de las plaquetas y su adhesión firme a la pared. En el proceso de interacción entre plaqueta y colágeno participan dos receptores plaquetarios, la GPVI y la integrina $\alpha_2\beta_1$. La activación de las plaquetas mediada por GPVI permite una firme adhesión de las plaquetas y la secreción de las sustancias procoagulantes y proinflamatorias contenidas en ellas, lo que hace que el trombo crezca y se consolide su formación. Además, a la unión de las plaquetas al colágeno sigue la expresión de fosfatidilserina sobre la membrana plaquetaria. La fosfatidilserina proporciona actividad protrombinasa, que aumenta la formación de trombina. (Macaya et al., 2013).

Las plaquetas adheridas permanecerán vivas durante horas o días en el sitio de la lesión vascular y liberarán microvesículas con actividad proinflamatoria y protrombótica.

Después de 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. Esto es posible por la acumulación local de agonistas de la activación de las plaquetas adrenalina, trombina y colágena tras lo cual se activan las enzimas de membrana fosfolipasa C y fosfolipasa A2 que catalizan liberación de ácido araquidónico que mediante la ciclooxigenasa que produce endoperoxidos que pueden formar prostaciclina PGI₂ en presencia de prostaciclín sintetasa o Tromboxano A₂ en presencia de tromboxano sintetasa, estos productos inhiben o aumentan la actividad de la fosfolipasa C respectivamente.

La hidrólisis del fosfolípido de membrana produce fosfatidil inositol (PIP₂), diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). Este último interviene en el movimiento de calcio en el citosol plaquetario y estimula la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina, que interactúa con la actina para facilitar el movimiento de los gránulos plaquetarios.

DAG activa la proteínasa C, que a su vez fosforila otras proteínas que sirven para la secreción de los gránulos plaquetarios.

La activación plaquetaria ocurre principalmente a través de los receptores P₂Y₁, PAR₁₋₄ y TP alfa (Fox et al., 2013). El ADP liberado de los gránulos densos, mediante su unión a los receptores P₂Y₁ es lo que origina la activación inicial reversible y cambio conformacional, mientras su unión al receptor P₂Y₁₂, inhibe la adenilato ciclasa y reduce la formación de adenosinmonofosfato cíclico (AMP_c) en la plaqueta, lo que facilita su activación. El ADP, por su unión a los receptores P₂Y₁, produce la activación de la fosfolipasa C. Estos dos receptores están acoplados a proteínas G_q y G_i respectivamente.

Las plaquetas ahora activadas, cambian su estructura y aumentan su actividad excretora para liberar tromboxano A₂ y adenosina di-fosfato (ADP) y promover una mayor activación y agregación en otras plaquetas en un fenómeno de auto-amplificación a través de los mismos receptores ahora más expuestos y activos.

En este punto, el papel de la trombina es fundamental como un importante amplificador de este fenómeno al incrementar la afinidad de los receptores plaquetarios.

Las plaquetas se activan por la interacción con (ADP) y Tromboxano A₂ que movilizan vesículas intracelulares y provocan la expresión de moléculas de adhesión interplaquetaria, como las proteínas IIb/IIIa,.

La etapa final es la activación de los receptores IIb/IIIa, que reciben y unen de forma irreversible a la fibrina que se ha liberado por la activación de la cascada de coagulación y posibilitan la unión del fibrinógeno y también del FvW, lo que permite el establecimiento de puentes estables entre las plaquetas (**Figura 2**).

El receptor más abundante en la plaqueta es la integrina α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) con aproximadamente 50.000-80.000 unidades en la superficie de cada plaqueta. La unión entre las subunidades GPIIb y GPIIIa ocurre mediante unión no covalente, lo que genera el receptor heterodimérico. La mayoría de las GPIIb/IIIa se encuentran en la superficie plaquetaria, y sólo una pequeña parte se almacena en los gránulos α y en el sistema canalicular de la plaqueta, sistema de canales ramificados que se conectan a la membrana externa de la plaqueta. En las plaquetas circulantes, la GPIIb/IIIa se encuentra en estado de baja afinidad, que se transforma en alta afinidad después de la activación de estas células.

La GPIIb/IIIa interviene en la adhesión de la plaqueta a la pared vascular y también en la interacción entre plaquetas, lo que se conoce como agregación plaquetaria, mediante la interacción de dos GPIIb/IIIa localizadas en plaquetas diferentes que se unirán entre sí a través del fibrinógeno, que hará de nexo. Aunque el fibrinógeno es el ligando principal de la GPIIb/IIIa, otras moléculas como el FvW, la fibronectina y la vitronectina se unen también a la GPIIb/IIIa. Todas lo hacen a través de una región específica localizada en estas moléculas, conocida como región RGD por ser la nomenclatura de los aminoácidos que conforman esta región (arginina, glicina, aspártico). Por lo tanto, los péptidos que contienen la secuencia RGD son capaces de interactuar con la GPIIb/IIIa e inhibir su interacción con otras moléculas. Existen otras secuencias peptídicas reconocidas por la GPIIb/IIIa, como por ejemplo lisina-glutamina-alanina-glicina-

aspártico-valina. A diferencia de la región RGD, esta secuencia de 6 aminoácidos sólo se ha localizado en el fibrinógeno.

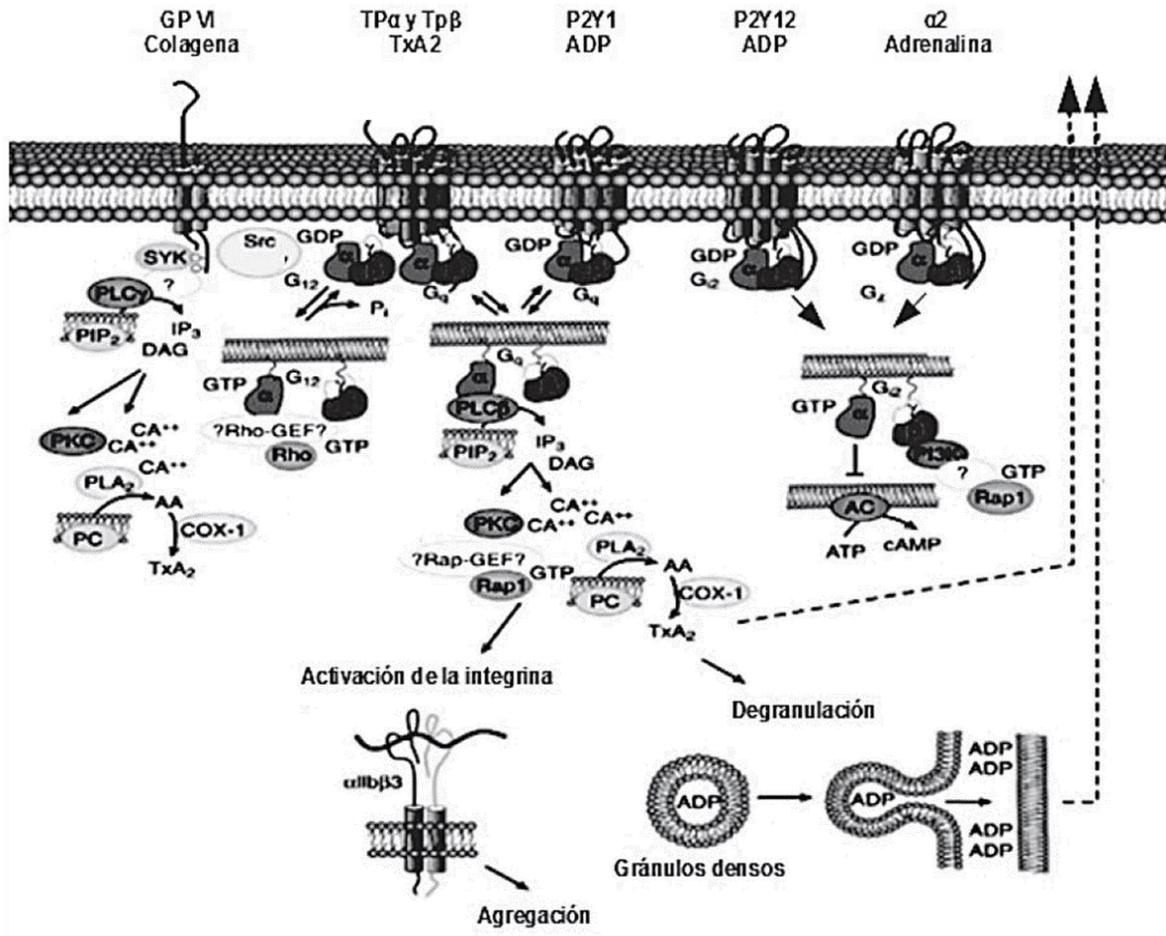


Figura 2. Mecanismos intracelulares de respuestas a agonistas
Se observan las vías de señalización implicadas con cada receptor para la activación plaquetaria. Tomado de Vargas et al., 2011.

En la última etapa de la formación del trombo interviene el fibrinógeno y la red de fibrina formada a través de las vías séricas extrínseca e intrínseca para la formación del trombo blanco característico de la trombosis arterial aguda.

En el caso de la cardiopatía isquémica y el infarto del miocardio, las plaquetas tienen un papel fundamental, ya que no solo promueven la formación del trombo sino en su propagación mediante la liberación de PAI-1 que lo hace resistente a la

lisis y de tromboxano A₂ que produce vasoconstricción (Jenne et al., 2013) (Figura 3).

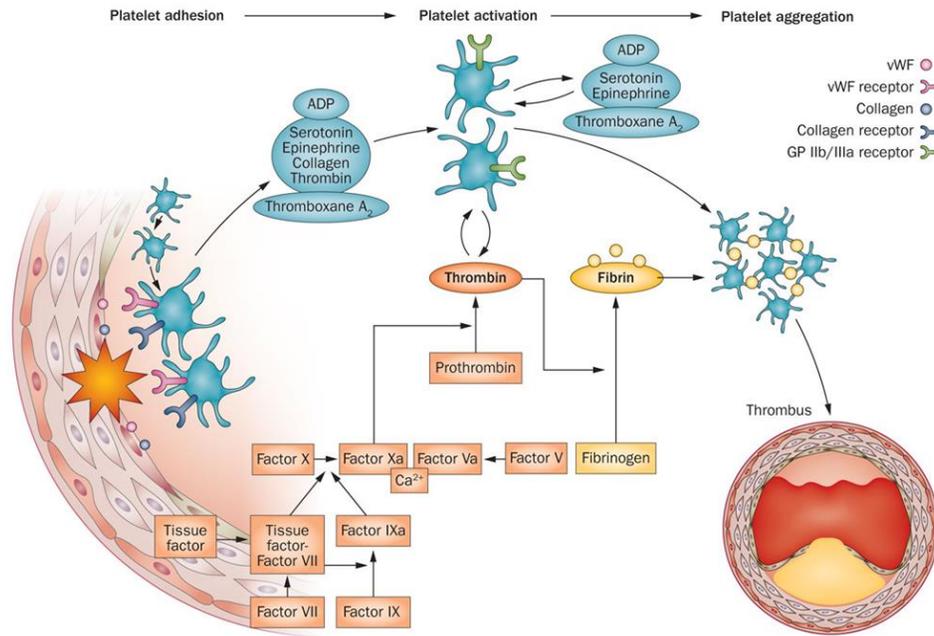


Figura 3. Mecanismo de formación de trombo en enfermedad coronaria. Se observan los mecanismos implicados en la formación de trombo intra-arterial. (Tomado de Franchi et al., 2014).

Con ello llevan a la agregación plaquetaria generalizada formando un trombo blanco, inicialmente pequeño y no obstructivo. Esto puede evolucionar para atrapar células formes de la sangre, como eritrocitos, y formar un trombo rojo que es de mayor tamaño y generalmente oclusivo por lo que se interrumpe el flujo de sangre en forma anterógrada, provocando el imbalance entre el consumo y el aporte de oxígeno y nutrientes a la zona irrigada por el vaso ocluido, y con ello la lesión y muerte del miocito (Davi et al., 2007; Fitzgerald et al., 2000).

La diabetes está fuertemente asociada a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, esta se asocia a una mayor extensión de la enfermedad coronaria, con un curso más agresivo y una morbilidad más elevada que en pacientes con cardiopatía isquémica sin DM. Estudios pasados han sugerido que la obesidad y la resistencia a la insulina puede influir en la dinámica de reactividad plaquetaria (Schneider et al., 2009).

Diabetes Mellitus (DM) causa un estado protrombótico mediante aumento en la coagulación, fibrinólisis inadecuada, disfunción endotelial e hiperactividad de plaquetas.

La hiperglucemia provoca cambios en las plaquetas: aumentan las moléculas de adhesión, hay diferencias en marcadores de activación plaquetaria (CD31, CD49B, CD62P, CD63) aumenta la expresión de receptores de membrana (GPIB, FVW, IIBIIIA, P-selectina, CD40L), la glicación no enzimática de proteínas de membrana disminuyen su fluidez y aumentan adhesión, el efecto osmótico de la glucosa activa expresión de P-selectina, IIbIIIA, provoca activación de proteinkinasa c, en la cascada de la coagulación la hiperglucemia provoca un aumento de factor tisular, FVW e inhibe la fibrinólisis.(Ferreiro et al. 2010)

La plaqueta que expresa receptores de insulina (Ri) y factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) lo que la hace sensible a la insulina. El déficit y resistencia a la insulina provoca: aumento de PGI₂ prostaciclina ligada a adenilato ciclasa e induce liberación de activador del plasminogeno, el Ri se heterodimisa para formar IGF-1-insulina,, el IGF-1 contenido en gránulos alfa en altos niveles provocan aumento de amplificación de agregación plaquetaria, la estimulación por IGF1 es dosis dependiente de fosforilación IGF1 y tirosina del sustrato 1 de Ri y estimula su unión con la subunidad fosfoinositol kinasa Pi3K que da fosforilación de protein kinasa b involucrada en respuesta a insulina e IGF1, la resistencia a la insulina aumenta el Ca intracelular aumentando degranulación y agregación, hay una secreción inadecuada de NO y PGI₂ las cuales en función normal retardan la agregación plaquetaria. Adicional a estos cambios los pacientes diabéticos se asocian a inflamación sistémica y aumento de marcadores de activación plaquetaria y coagulación, así mismo tienen plaquetas reticuladas de mayor tamaño y mayor reactividad medida por liberación total de gránulos (Ferreiro et al., 2010)

La obesidad condiciona disfunción plaquetaria mediada por aumento de la cuenta y volumen plaquetario, aumento de leptina en suero, mayor concentración de Ca citosolico en plaquetas y un aumento de estrés oxidativo que en conjunto con dislipidemias provoca una glicación de LDL que aumenta concentración

intracelular de Ca y NO, aumenta contenido de apo e de LDL y su interacción con receptor LDL en plaquetas, disminución de HDL asociado a disfunción endotelial y disminución de NO (Ferreiro et al., 2010).

Se ha descubierto que la LDL oxidada promueve la activación plaquetaria desregulada en desordenes dislipidemicos, aunque la LDLox estimula la señalización activadora aún no es claro la manera en que esto conduce a trombosis. El mecanismo que se ha descrito para la hiperreactividad plaquetaria requiere la generación de especies reactivas de oxígeno, bajo el flujo arterial LDLox desencadena la generación sostenida de ROS dentro de la plaqueta. LDLox se une al receptor CD36 de la plaqueta para estimular la tirosin kinasa y la activación dependiente de PKC de NOX2 y generación de ROS.

La LDLox y los ROS inducidos por hiperlipidemia median la desensibilización a la señal inhibitoria de GMPc que facilita la activación plaquetaria y formación de trombo (Magwenzi et al., 2015).

POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (SNP)

Dentro de las variaciones del ADN entre los individuos, los SNP que consisten en el cambio de una base nitrogenada que se encuentra presente en al menos 1% de la población, son la forma más simple y común de variaciones genéticas. Los SNP pueden resultar en cambios funcionales de la proteína, influenciar la actividad del promotor de un gen modificando así la expresión génica, la conformación y estabilidad del ARNm, así como la localización subcelular del mensajero y/o proteína. Los SNP son responsables de la diversidad fenotípica entre los individuos, de las diferencias en la respuesta a fármacos así como la predisposición a enfermedades (Lai., 2001; Lewin., 2008).

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina locus. A cada posible variante se le denomina alelo. Si se trata de un SNP, serán 2 los posibles alelos en un locus: por ejemplo el cambio de T por C (T > C). Si el locus corresponde a un cromosoma autosómico (del 1 al 22). Cada individuo es

portador de 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y madre de manera independiente. La pareja de alelos observada en un individuo se denomina genotipo. Los individuos con los 2 alelos idénticos se denominan homocigotos y los que tienen diferentes alelos, heterocigotos (Iniesta et al., 2005; Attia et al., 2009).

EFECTO DE LOS SNP EN EL RECEPTOR P2Y12

Aunque las mutaciones del gen P2Y12 causan diátesis hemorrágicas, los polimorfismos comunes podrían tener implicaciones en la aterotrombosis (Shiraga., 2005; Fontana et al., 2003; Ziegler et al., 2005), Se ha descrito la influencia de polimorfismos genéticos del receptor P2Y12 en la respuesta a la activación de este por el ADP o la respuesta de los pacientes a la terapia antiplaquetaria a los inhibidores de este receptor y que los polimorfismos en el receptor pueden estar relacionados con la variabilidad interindividual de la respuesta plaquetaria y se han sugerido como uno de los mecanismos gran variabilidad subyacente en respuesta a la terapia antiplaquetaria en la enfermedad arterial coronaria.

El gen P2RY12 de 47 Kb está localizado en el cromosoma 3q21-q25, y codifica para el receptor P2Y12 la diana farmacológica de los antiplaquetarios. Este es un receptor acoplado a proteína Gi presente en plaquetas (**Figura 4**), células gliales, y células musculares lisas, contiene 342 aminoácidos incluyendo 4 residuos extracelulares Cys en las posiciones 97, 270, 17 y 175, estas dos últimas que están unidas por puentes disulfuro y son importantes para la expresión del receptor; asimismo, 2 sitios de glucosilación en su extremo N-terminal extracelular modulan su actividad. El gen P2RY12 contiene 3 exones y se han descrito 9 SNP para este receptor (National Center for Biotechnology Information). Estos SNP no generan un cambio en la secuencia final de aminoácidos, sin embargo si interfieren en la regulación del gen, y como consecuencia se afecta la función del receptor en la respuesta plaquetaria (Galic et al., 2013).

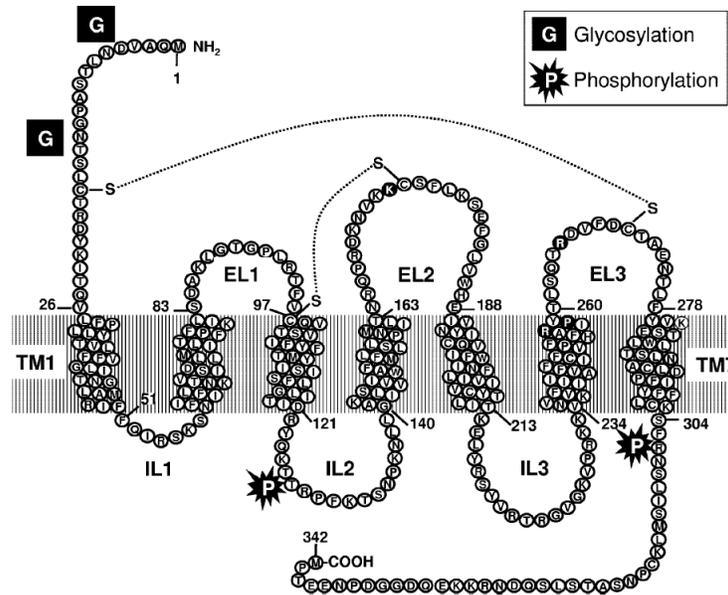


Figura 4. Estructura del receptor P2Y12

TM, región transmembrana; EL, Loop Extracelular; IL, Loop Intracelular (Tomado de Cattaneo, 2011).

En población mexicana se han encontrado diferencias en la frecuencia de aparición de los polimorfismos asociados a respuesta de terapia antiplaquetaria comparado con sudamericanos, caucásicos, asiáticos y africanos. Los resultados de la frecuencia alélicas (FA) reportadas en diferentes poblaciones se resumen en la **Tabla 1** (Vargas et al., 2014).

Tabla 1. Frecuencia alélicas reportadas para polimorfismos rs6809699 y rs6785930. Modificado de Vargas et al., 2014.

SNP	Sitio de SNP	Alelo	FA MÉXICO	FA FRANCIA	FA COREA	FA ÁFRICA
rs6809699	G52T	G	87.1	86.2	80.0	100.0
		T	12.8	13.8	20.0	0.0
rs6785930	C34T	C	70.6	72.5	76.0	85.3
		T	29.3	27.5	24.0	14.7

FA: frecuencia alélica.

Es importante destacar que el polimorfismo T744C es uno de estos polimorfismos que han sido asociado con un aumento de la agregación de plaquetas, Fontana et al. (2003) encontró que el haplotipo H2 del gen P2RY12 se asocia con aumento de la función plaquetaria en pacientes sanos. En base a este estudio se investigó este mismo polimorfismo en pacientes con enfermedad arterial periférica (EAP) encontrando un aumento en la frecuencia del haplotipo en pacientes con EAP que en pacientes sanos (30% y 21%, respectivamente; OR, 1.6; CI, 1.1-2.5; P=0.02 en el análisis univariado). Esta asociación permaneció en pacientes con EAP (OR, 2.3; CI, 1.4-3.9; P=0.002) (Fontana et al., 2003), estos datos sugieren la posible implicación de este polimorfismo en la fisiología aterosclerótica. Concordando con esto un estudio subsecuente reportó asociación con pobre respuesta al clopidogrel en pacientes sanos tratados con el fármaco y con el haplotipo H2/H2 evaluado por citometría de Flujo (Bura et al., 2006). En pacientes egipcios se encontró asociación del polimorfismo con aumento en la reactividad plaquetaria en pacientes post infartados, encontrando una frecuencia en pacientes TT 72.2%, CT y CC 27.5%; mientras que en los controles se encontró TT 97.5% y CT y CC 2.5% (Zoheir et al., 2013). Por el contrario, Cuisset et al. (2007) estudiaron la expresión del polimorfismo T744C del P2Y12 donde no se encontró significancia de la influencia del polimorfismo y la respuesta al clopidogrel, concordando esto con los resultados encontrados por Angiolillo et al. (2005).

Otro de los SNP que ha mostrado significancia como factor predictor de la respuesta reducida a las tienopiridinas independiente de otras variables clínicas y demográficas es el C34T (Ziegler et al., 2005; Galic et al., 2013). Se estudió el SNP C34T en pacientes con EAP encontrando que la presencia de un único alelo T aumenta el riesgo ajustado 4 veces de padecer eventos neurológicos, comparado con los portadores del alelo C (95% IC, 1.08-14.9) (Ziegler et al., 2005).

Recientemente se han asociado los SNP rs6785930 y rs6809699 con un mayor riesgo de sangrado en población China en pacientes post-intervención coronaria percutánea de acuerdo a tromboelastografía, y puntaje de riesgo de sangrado con rs6785930 (OR: 2.305, 95%CI: 1.180-4.503, P=0.015), rs6809699 (OR: 3.227,

95%CI: 1.587-6.558, P=0.001) (Zang et al., 2014). Este mismo grupo analizó el mismo riesgo de sangrado construyendo un puntaje genético de polimorfismos asociados a sangrado incluyendo rs6809699, encontrando un aumento de riesgo 3.268 (95%CI=1.198-8.929, P=0.021) en pacientes con puntaje genético más alto (Zang et al., 2014). Otro estudio realizado en pacientes sanos evaluó el rs2046934 y rs6785930 encontrando que en la presencia de estos SNP había una reducción en la activación de la glicoproteína IIb/IIIa ($P < 0.001$) y la expresión del CD62P ($P=0.035$). De igual forma se encontró mayor inhibición plaquetaria en presencia de terapia antiplaquetaria con Cangrelor (Oestrich et al., 2014). La explicación a estas diferencias puede estar relacionada con el tipo y la dosis del agonista utilizado para la evaluación de la función plaquetaria.

TERAPIA ANTIPLAQUETARIA

Los pacientes con intervención coronaria percutánea se encuentran en riesgo de desarrollar trombosis del stent, el desarrollo de terapia antiplaquetaria permitió disminuir esta complicación. Pese a ello la trombosis del stent aún se presenta en el 0.5 - 2% del total de los pacientes; de este porcentaje el 8.5% sufre muerte, reinfarto o stroke, mientras que el 21.4% requerirán una nueva revascularización a un año (Galic et al., 2013).

Los llamados antiplaquetarios son fármacos capaces de inhibir la función plaquetaria específicamente en la fase de agregación. Lo anterior es posible por inhibición de sus vías metabólicas de activación como es el caso de la aspirina, o mediante el bloqueo competitivo de algunos de sus receptores como son el P2Y₁₂ (tienopiridinas y ticagrelor). La **Tabla 2** recopila las principales características de estos fármacos.

Tabla 2. Características de diferentes antiplaquetarios. Modificado de Franchi et al., 2014.

	Clopidogrel	Ticagrelor	Prasugrel
Dosis inicial	600 mg	180mg	60mg
Dosis de mantenimiento	300mg y 75 mg día	90mg 2 veces por día	10mg/día
Inicio de efecto	2-4 hr	30 min	30 min
Tiempo para efecto máximo	4-6 hr	2 hr	2 hr
Vida media	6 hr	6-13 hr	2-15hr (media 7 hr)
Duración de efecto	3-10 días	3-7 días	5-10 días

INHIBIDORES RECEPTOR P2Y12

1. CLOPIDOGREL.

El clopidogrel es sin duda el más estudiado y prescrito de los antiplaquetarios en el manejo de la intervención coronaria; asimismo es la base del nuevo concepto farmacológico de la terapia antiplaquetaria dual (Bode et al., 2008). El clopidogrel, es una tienopiridina de segunda generación cuyo metabolito activo se une irreversiblemente al receptor plaquetario P2Y12 e inhibe la acción del ADP y colágena para exponer el receptor GP IIb/IIIa y por tanto la agregación plaquetaria. Se trata de una pro-droga de la cual se absorbe el 50% y solo el 15% del producto inicial es susceptible de ser bio-transformado en metabolito activo (Plosker et al., 2007). Se requieren dos pasos metabólicos consecutivos por el citocromo P450 y sus iso-enzimas. La presencia de SNP en el gen codificante para la enzima CYP2C19 se ha asociado con variación en la respuesta. Su inicio de acción es en horas y con una dosis de 75 mg se alcanza una adecuada inhibición de la agregación plaquetaria en 3 a 7 días. Con la dosis de carga de 300 mg esta se obtiene en 12 a 24 horas y con 600 mg hasta en 2 horas. La dosis de mantenimiento sugerida es de 75 mg al día. A pesar de una vida media corta de 6 horas, su acción irreversible sobre el receptor plaquetario requiere al igual que la

aspirina, de al menos 5 días para recuperar una adecuada función plaquetaria. Su eliminación es en 60% por vía renal. Existe una gran variabilidad interpersonal en la respuesta al clopidogrel, lo que hace que hasta el 30% de los pacientes no tengan una adecuada respuesta antiagregante plaquetaria, lo cual se ha asociado a una mayor frecuencia de eventos clínicos trombóticos (Plosker et al., 2007, Gross et al., 2009).

A pesar de este demostrado beneficio, tiene un muy buen perfil de seguridad, con mejor tolerancia gástrica que la aspirina y similar incidencia de hemorragia (Plosker et al., 2007). Cuando se asocia con aspirina el riesgo de hemorragia en pacientes con enfermedad aguda y sometidos a intervención, es de entre 3 y 4%, esto antes del uso del acceso vascular por vía radial.

Existen interacciones farmacológicas con el clopidogrel que vale la pena mencionar. La primera de ellas es con los inhibidores de la bomba gástrica de protones (PPIs) ó “prazole”. Hay suficiente información para afirmar que el uso de omeprazol, ezomeprazol y lanzoprazol disminuye el efecto antiagregante del clopidogrel, por lo que su uso debe limitarse a pacientes con bajo riesgo de trombosis y alto riesgo de hemorragia (Hulot et al., 2011). El pantoprazol parece ser la mejor alternativa en este caso, al tener un menor efecto sobre el citocromo P450 (Angiolillo et al., 2011).

Las guías clínicas actuales establecen, un inhibidor de receptores P2Y12 debe siempre agregarse al manejo con aspirina. En el caso de clopidogrel la dosis de carga es recomendada de 300 a 600 mg a la brevedad según en caso.

En cuanto a la duración del tratamiento en pacientes tratados con stent coronario ha sido y es motivo de controversia aún a la fecha. La principal preocupación ha sido siempre en relación al riesgo de trombosis aguda y tardía del stent (Mauri et al., 2007). Varios estudios relativamente pequeños demostraron igual eficacia en los regímenes menores a 6 meses o mayores de 1 año de terapia antiplaquetaria dual (Mauri et al., 2007; Pandit et al., 2015).

2. PRASUGREL.

El prasugrel es una potente tienopiridina de tercera generación que se une irreversiblemente al receptor P2Y12 inhibiendo la agregación plaquetaria

dependiente de ADP. Su absorción después de la administración vía oral es de >80% y su biodisponibilidad es superior a la del clopidogrel. Es también una prodroga pero sólo requiere de un paso metabólico a través del citocromo P450. Esto lo hace 5 a 9 veces más potente que su predecesor y con una dosis de carga de 60 mg alcanza 75% de inhibición de la agregación plaquetaria en 1 hora. A diferencia de clopidogrel, hay muy poca variabilidad individual en su efecto y no parece haber alteración con los polimorfismos genéticos del CYP2C1. Su interacción con otros medicamentos, en particular los “prazoles” es mucho menor. Por lo anterior, se recomienda administrar en dosis de inicial de 60 mg seguido de 10 mg al día como dosis de mantenimiento (Duggan et al., 2009).

Al ser un medicamento más potente en su acción antiplaquetaria, la incidencia de hemorragia es también 30% mayor que con el clopidogrel. Los grupos de mayor riesgo de hemorragia fueron los mayores de 75 años, pacientes de peso menor a 60 Kg y aquéllos con antecedente de enfermedad vascular cerebral. En esta población de alto riesgo se ha sugerido en forma empírica el administrar la mitad de la dosis (5 mg) al día para disminuir el riesgo y estaría contra-indicado en pacientes con historia de enfermedad vascular cerebral (Bhatt, 2009). Es ideal para pacientes de bajo riesgo de hemorragia en quienes la decisión de intervención se toma en sala. En las guías clínicas se menciona que en pacientes en quienes se conozca la anatomía coronaria y sin alto riesgo de hemorragia es “razonable” preferir prasugrel sobre clopidogrel (Amsterdam et al., 2014, Ibañez et al., 2017, Valgimigli et al., 2017). En algunos pacientes seleccionados, tratados con clopidogrel y que se consideren con alto riesgo clínico de eventos o trombosis de stent y bajo riesgo de hemorragia, el cambiar a prasugrel produce un efecto antiplaquetario más eficaz.

3. TICAGRELOR.

Se trata de un nuevo grupo de fármacos no-tienopiridínicos, las ciclopentil-tiazolopirimidinas. Actúa al unirse en forma reversible y no-competitiva al receptor P2Y12. El ticagrelor tiene una afinidad por el receptor P2Y12 y no inhibe directamente la unión del ADP, sino que se une a un ligando independiente del receptor, lo que

produce un cambio en la conformación del mismo y lo vuelve insensible a la acción del ADP; ello evita la señalización que induce la actividad plaquetaria. Esta propiedad lo hace afín a los receptores P2Y₁₂ no plaquetarios localizados principalmente en los vasos sanguíneos involucrados en la respuesta vasoconstrictora. El ticagrelor es un fármaco administrado por vía oral que no requiere ser metabolizado a nivel hepático y por tanto su acción es más rápida y potente que las tienopiridinas, logrando el 95% de inhibición en la agregación plaquetaria en menos de 2 horas. La vida media es también corta lo que hace que deba administrarse cada 12 horas. Su fármaco-dinámica hace que haya una alta eficacia, poca variabilidad en la respuesta y mínima interacción con otros fármacos (Deeks, 2011).

A pesar de su mayor potencia, la frecuencia de hemorragia mayor valorada en estudios clínicos es similar a la observada con clopidogrel. Un efecto adicional de ticagrelor es bloquear la captación de adenosina en su nucleótido transportador y aumentar su acción a nivel local. El incremento de adenosina produce vasodilatación y aumento del flujo coronario. Es a través de este mecanismo que se explica también el aumento en la frecuencia de pausas ventriculares así como disnea hasta en el 14% de los casos. Estos efectos son habitualmente transitorios y solo ameritan la suspensión del fármaco en menos del 1% de los casos (Wallentin et al., 2009).

Las guías clínicas recomiendan el uso de ticagrelor a dosis de carga de 180 y de mantenimiento con 90 mg cada 12 horas como alternativa en pacientes con síndromes coronarios agudos de alto riesgo y se menciona como alternativa preferible al clopidogrel en pacientes con estrategia invasiva temprana. (Amsterdam et al., 2014, Windecker et al., 2014, Ibañez et al., 2017, Valgimigli et al., 2017).

HIPÓTESIS

La presencia de los SNP rs6809699, rs6785930 en el receptor plaquetario P2Y12 se asocian con una disminución en la agregación plaquetaria en pacientes con enfermedad coronaria aguda bajo tratamiento antiplaquetario. Por otra parte, la presencia del SNP rs2046934 en el receptor plaquetario P2Y12 se asocia con un incremento en la agregación plaquetaria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la agregación plaquetaria en presencia de los SNP rs6809699, rs6785930 y rs2046934 en el receptor plaquetario P2Y12 en pacientes con enfermedad coronaria aguda bajo tratamiento con antiplaquetarios.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los SNP rs6809699, rs6785930 y rs2046934 en el receptor plaquetario P2Y12 en pacientes con enfermedad coronaria aguda bajo tratamiento antiplaquetario.
2. Determinar la variabilidad de agregación plaquetaria obtenida con el tratamiento antiplaquetario en pacientes con enfermedad coronaria aguda.
3. Determinar la variabilidad de agregación plaquetaria en presencia de los SNP rs6809699, rs6785930 y rs2046934.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO

Observacional, descriptivo, transversal.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes mayores a 18 años con enfermedad arterial coronaria confirmada mediante angiografía a quienes se les realizó tratamiento mediante intervención coronaria percutánea e implante de stent por hemodinamistas certificados con tratamiento antiplaquetario dual con dosis de mantenimiento (90mg) con inhibidores directos del receptor P2Y12 (Ticagrelor) que haya sido indicado por su médico en base a guías internacionales.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes con uso concomitante de inhibidores del receptor IIb/IIIa y/o terapia anticoagulante. Pacientes con enfermedades hematológicas diagnosticadas. Pacientes hemodinámicamente inestables. Pacientes que no hayan firmado el consentimiento informado.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras que al momento de su procesamiento se encuentren coaguladas y no sea posible la realización de prueba, muestras que no sea posible extracción de DNA con calidad adecuada

PRUEBAS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA

La variable de valoración principal fue la reactividad del receptor P2Y12 cuantificada mediante el sistema VerifyNow® system P2Y12 (Acumetrics, USA). El

VerifyNow® system es una prueba de sangre completa que se basa en la interacción entre los receptores de las plaquetas y cubiertas de fibrinógeno que inducen su aglutinación. El sistema VerifyNow P2Y12 utiliza ADP 20µm con 22nm de prostaglandina E1 como agonistas. La PGE1 se añadió para incrementar la actividad intraplaquetaria de cAMP que incrementa la sensibilidad de la prueba del ADP en relación al receptor P2Y12 y suprime que los receptores P2Y1 incrementen los niveles de calcio intracelular.

Se colectó sangre con técnica establecida por el manual tomando por punción venosa, los dos ml iniciales de la muestra se desecharon, se tomaron posteriormente 2 ml adicionales en tubo con citrato de sodio, se mezcló 5 veces y se dejó reposar durante 15 min antes de ingresarlo al sistema VerifyNow®.

La absorción de la luz de la muestra se midió en función del tiempo y la tasa de aglutinación y se cuantificó en unidades de reactividad plaquetaria (PRU). La reactividad plaquetaria no relacionada con el efecto de las tienopiridinas (reactividad basal) se valoró con un primer canal, y es una medida independiente basada en la tasa y extensión de agregación plaquetaria en el canal iso-TRAP (péptido activador del receptor de trombina). Los canales de ADP-PGE1 e iso-TRAP están calibrados para que la máxima agregación sea idéntica. Esto sirve para estimar la línea base de agregación plaquetaria independiente de la inhibición plaquetaria. La reactividad plaquetaria que permanece después de la inhibición del receptor P2Y12 mediada por el inhibidor P2Y12 se valoró mediante un segundo canal de detección de ADP (estos valores serán expresados en PRU).

El porcentaje de inhibición es el cambio desde la agregación basal, y se calculó en base a PRU obtenidas mediante acción del fármaco y reactividad plaquetaria basal.

DETERMINACIÓN DE LOS SNP rs6809699, rs6785930 y rs2046934

Se extrajo ADN de 50 µL de sangre con el protocolo de extracción mediante Trizol (Anexo 2) lo cual nos permitió obtener una concentración adecuada de ADN con

una calidad relación absorbancia 260/280 la cual se verificó con un espectrofotómetro.

Para el PCR tiempo real se utilizó el *TaqMan genotyping master mix* (Applied Biosystems, USA), el cual incluye oligonucleótidos específicos para la amplificación de las regiones de interés y las 2 sondas marcadas que permitieron la identificación de los SNP y el volumen de muestra necesaria con aproximadamente 20 ng de ADN.

La genotipificación se llevó a cabo en el termociclador StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA), donde se hizo un segmento de desnaturalización durante 15 segundos a 92°C y un segmento de extensión de 1 min a 60°C con un total de 40 ciclos.

EVALUACIÓN CLÍNICA

La evaluación clínica se realizó en la visita de la toma de muestra e incluyó cualquier evento cardiovascular mayor, trombosis, eventos hemorrágicos y su severidad del sangrado se evalúa con la clasificación del Consorcio de Investigación Académica Bleeding (BARC), disnea evaluada con la puntuación de Borg modificada, una escala categórica con descriptores verbales que categoriza de ninguna (0) a intolerable(10); Esta puntuación se eligió para superar los límites de la comparación de las puntuaciones numéricas atribuidas a una sensación subjetiva

RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados de los 43 pacientes incluidos en el estudio. La **Tabla 3** resume las características demográficas de la población.

Tabla 3. Características demográficas de los 43 pacientes incluidos.

VARIABLE	
Edad (años), promedio \pm SD	62 \pm 11.9
Género masculino n (%)	33(76.7)
IMC (kg/m ²), promedio \pm SD	28.4 \pm 4.7
Fumadores n (%)	5(11.6)
Diabetes mellitus, n (%)	13(30.2)
Hipertensión, n (%)	24(55.8)
Dislipidemia, n (%)	24(55.8)
Presentación clínica	
IMEST, n (%)	18(41.8)
IMSEST, n (%)	16(37.2)
Angina Inestable, n (%)	9(20.9)
Fracción de Eyección, promedio \pm SD	57.7 \pm 8.9
TFG (ml/min/1,73 m ²) promedio \pm SD	99.4 \pm 45.8
Hemoglobina (mg/dl), promedio \pm SD	14.38 \pm 1.75
Hematocrito (mg/dl), promedio \pm SD	43.4 \pm 4.6
Plaquetas (x10 ³ /ml), promedio \pm SD	243.7 \pm 110.3
Glucosa (mg/dl), promedio \pm SD	
Colesterol (mg/dl), promedio \pm SD	168.8 \pm 69.9
LDL (mg/dl), promedio \pm SD	97.7 \pm 62.4
HDL (mg/dl), promedio \pm SD	39.1 \pm 9.4
Triglicéridos (mg/dl), promedio \pm SD	167.3 \pm 98.6

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Se analizó la agregación plaquetaria obtenida mediante el ensayo Verify Now P2Y12 expresado en unidades de reactividad plaquetaria (PRU) (

Tabla 4) y se comparó la agregación basal con la obtenida tras administración del fármaco (**Figura 5**).

Tabla 4. Análisis estadístico variables cuantitativas pruebas de función plaquetaria.

Variable	Estadísticos	
VN PRU		
	Promedio (SD)	31.81(29.93)
	SEM	4.56
	Lim (Min-Max)	1-114
VN %INHIBICION		
	Promedio (SD)	81.93(17.02)
	SEM	2.59
	Lim (Min-Max)	28-99
VN PRU BASAL		
	Promedio (SD)	171.9(52.92)
	SEM	8.07
	Lim (Min-Max)	100-315

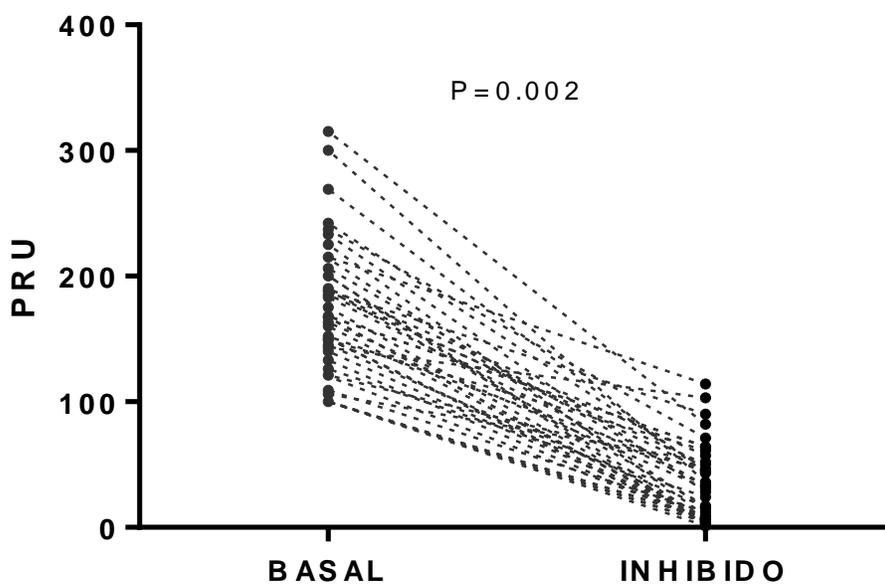


Figura 5. Unidades de reactividad P2Y12R (PRU).

Se observa el Δ cambio de PRU basales (izq.) a unidades PRU inhibidas (der.) Los valores de p fueron calculados usando la prueba estadística t de Student para datos pareados.

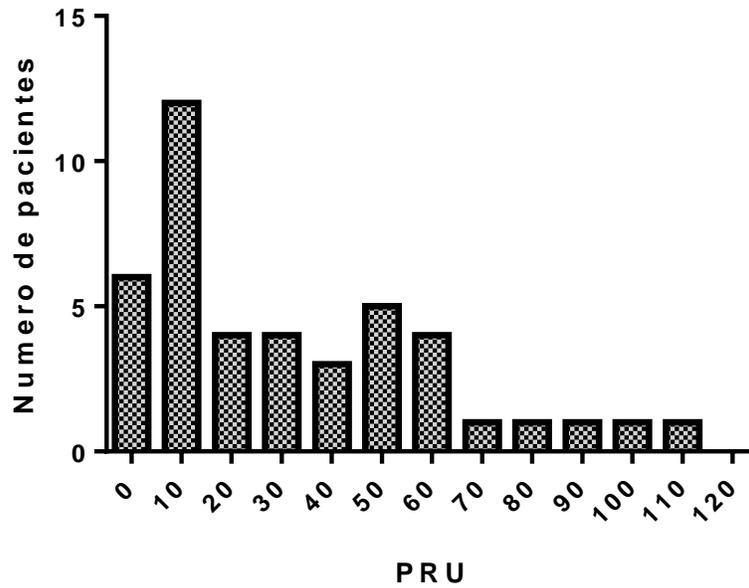


Figura 6. Histograma de distribución de frecuencias de PRU.

≥85 PRU: ventana terapéutica con mayor perfil de seguridad.<85 PRU: Valores de agregación plaquetaria de baja reactividad plaquetaria (LTPR): perfil de riesgo hemorrágico. Modificado de Alon Eisen et al., 2016.

Se comparó la agregación plaquetaria obtenida mediante el ensayo Verify Now P2Y12 en relación al género (**Figura 7**).

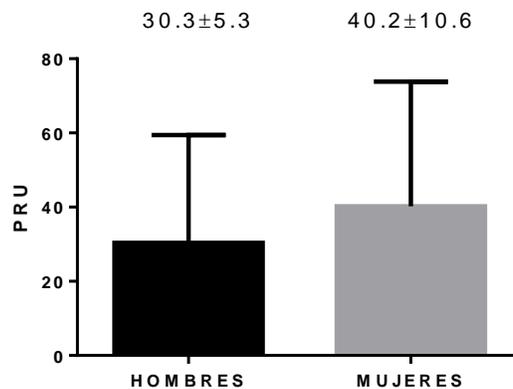


Figura 7. Comparación de agregación plaquetaria entre género.

Los valores de p fueron calculados usando la prueba estadística Mann-Whitney-Wilcoxon para muestras independientes, $p=0.57$; (Promedio±SEM).

Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman en relación al IMC (**Figura 8**), edad (**Figura 9**) y tasa de filtrado glomerular calculada por formula de cockcroft-gault (**Figura 10**).

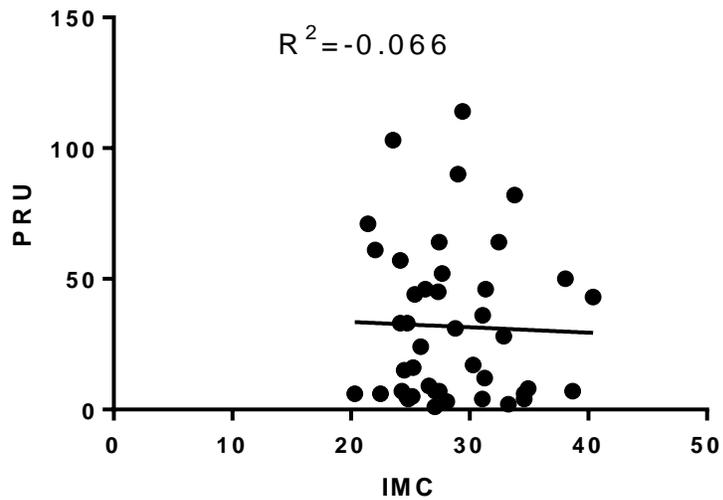


Figura 8. Agregación plaquetaria e IMC.
Coeficiente de correlación Spearman $p=0.84$

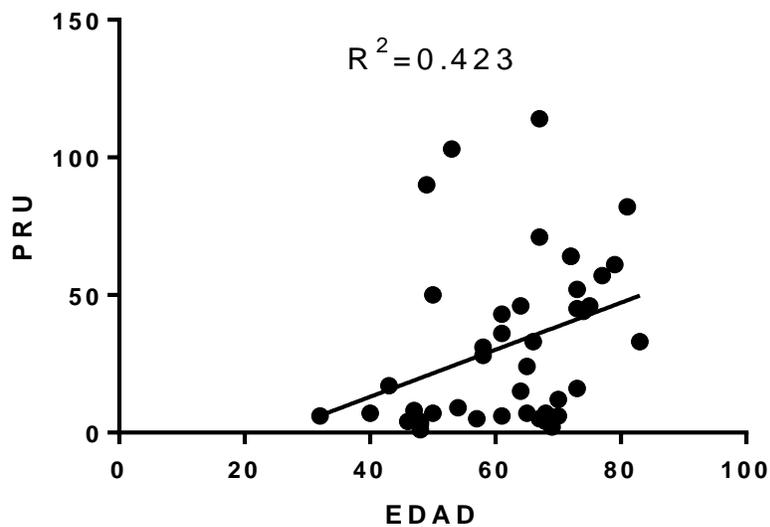


Figura 9. Agregación plaquetaria y edad.
Coeficiente de correlación Spearman para $p=0.004$

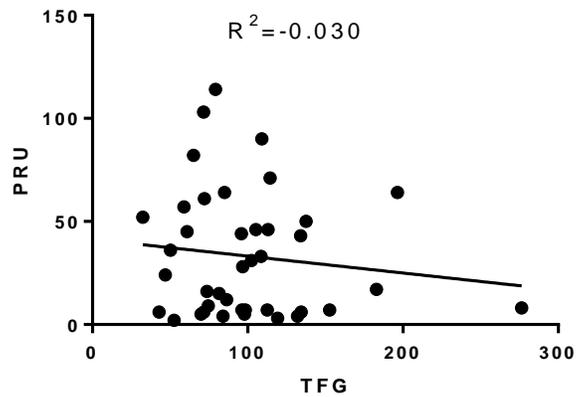


Figura 10 Agregación plaquetaria y TFG.
Coeficiente de correlación Spearman $p=0.685$

Se analizaron los valores de agregación plaquetaria en relación a poblaciones consideradas especiales debido a que la fisiopatología de dichas enfermedades (diabetes e IRC,) condiciona cambios moleculares a nivel plaquetaria de riesgo para eventos cardiovasculares mayores, por lo que dividieron en dos grupos mutuamente excluyentes definiéndolos con presencia o ausencia de la patología. (Figura 11).

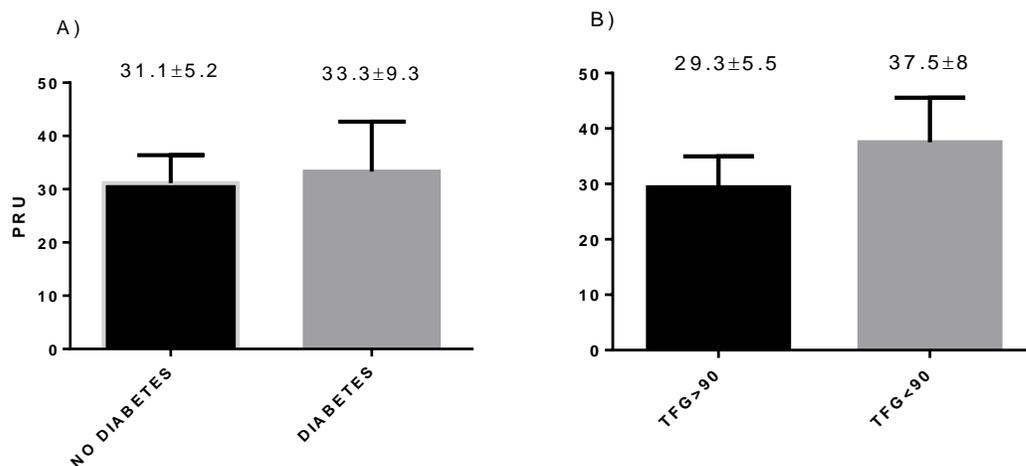


Figura 11. Comparación de agregación plaquetaria en poblaciones de riesgo.
A) Diabeticos vs no diabeticos, (Promedio \pm SEM) $p= 0.419$. **B)** Insuficiencia renal vs no insuficiencia renal (Promedio \pm SEM) $p=0.596$. Los valores de p fueron calculados usando la prueba estadística Mann-Whitney-Wilcoxon para muestras independientes.

Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman de los valores de factores de riesgo metabólicos cardiovasculares (**Figura 12**).

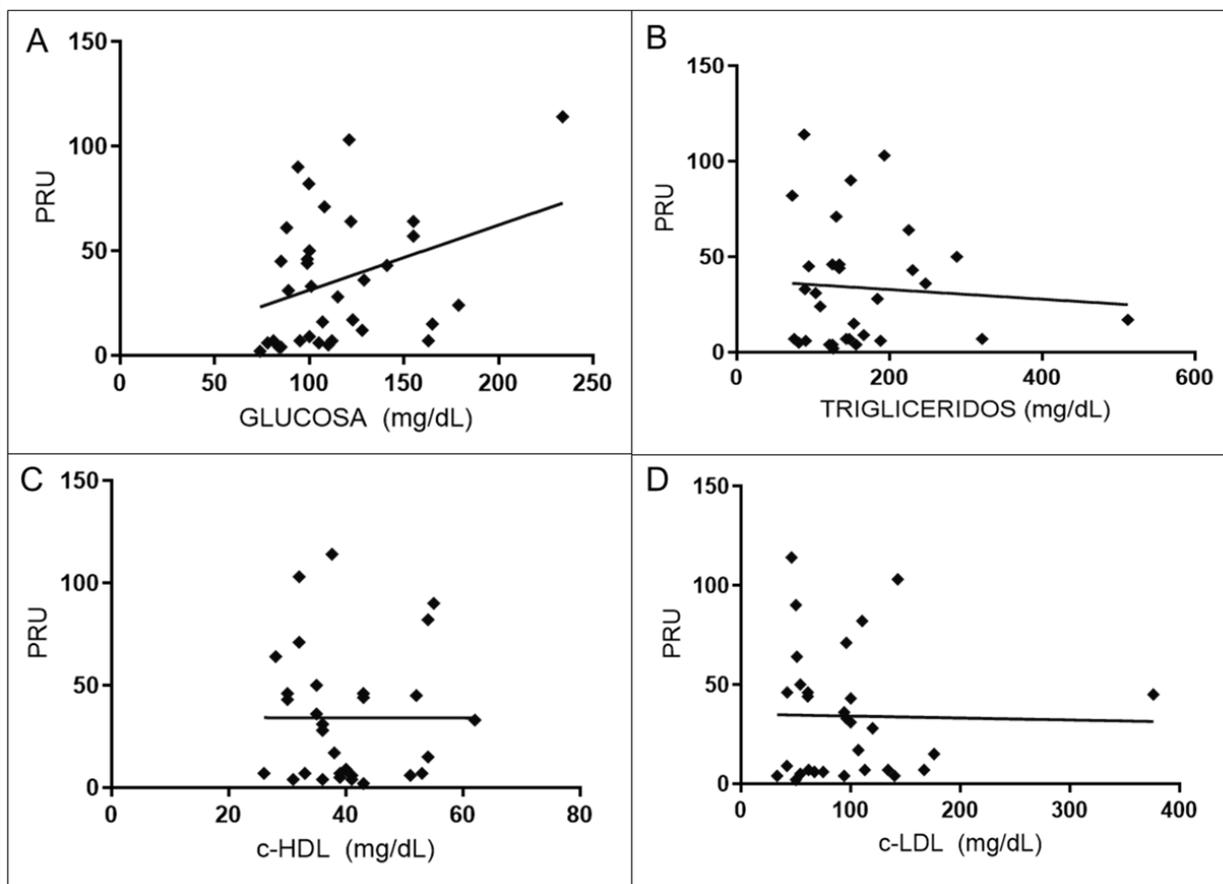


Figura 12. Coeficiente de correlación lineal de Pearson de factores de riesgo metabólicos cardiovasculares.

A) Glucosa (mg/dL) $R^2:0.292$ ($p=0.0440$). **B)** Triglicéridos (mg/dL) $R^2: 0.063$ ($p=0.736$), **C)** Colesterol de lipoproteína de alta densidad c-HDL (mg/dL) $R^2:-0.075$ ($p=0.690$) **D)** Colesterol de lipoproteína de baja densidad c-LDL (mg/dL) $R^2:-0.034$ ($p=0.85$).

Se analizaron los valores de agregación plaquetaria en relación a los valores del perfil de lípidos dividiéndolos en dos grupos mutuamente excluyentes: pacientes que se encontraban dentro de metas terapéuticas y pacientes fuera de metas terapéuticas según las guías internacionales de prevención secundaria: glucosa menor a 100 mg/dL, c-LDL menor a 70 mg/dL, c-HDL mayor 40 mg/dL y triglicéridos menor a 150 mg/dL (**Figura 13**). Las metas terapéuticas fueron

alcanzadas en 41% para glucosa 50% para c-LDL, 43% para c-HDL y 73% para triglicéridos.

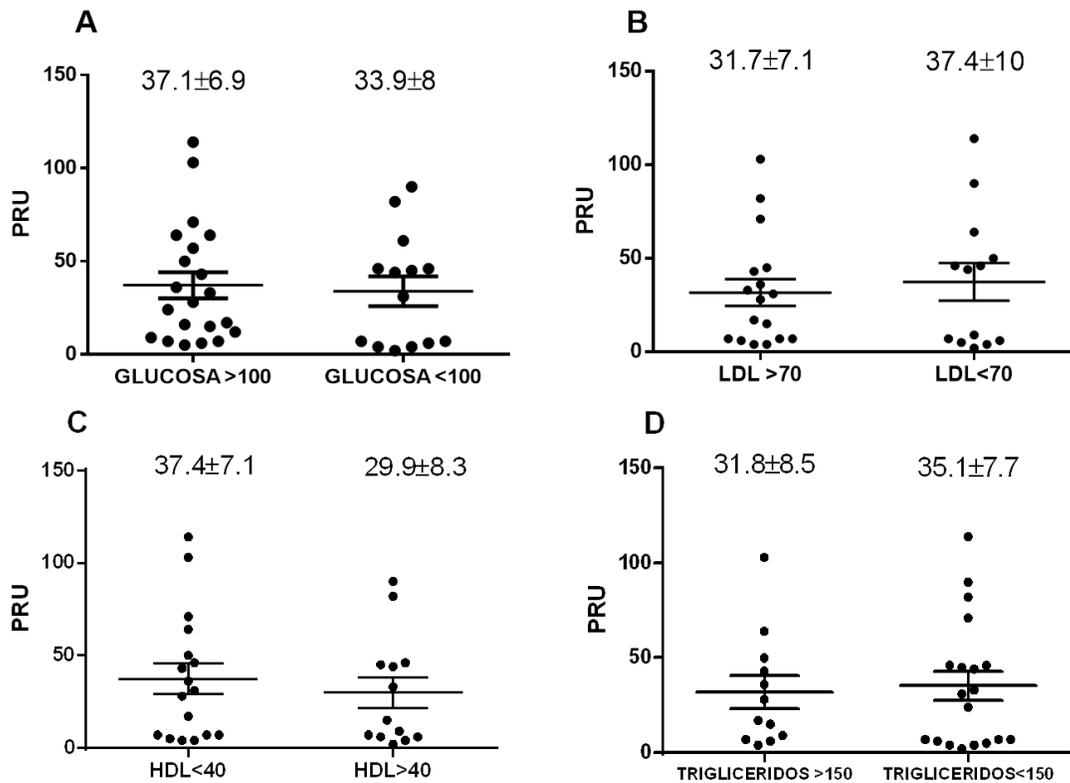


Figura 13. Comparación de agregación plaquetaria en relación de valores en meta de factores de riesgo metabólicos.

Los valores de p fueron calculados usando prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para muestras independientes (Promedio±SEM) **A)** Glucosa (mg/dL) $p=0.54$. **B)** Colesterol de lipoproteína de baja densidad c-LDL (mg/dL) $p=0.76$. **C)** Colesterol de lipoproteína de alta densidad c-HDL (mg/dL) $p=0.55$. **D)** Triglicéridos (mg/dL) $p=0.94$.

Las características clínicas se analizaron mediante scores de valoración clínica, el sangrado se evaluó mediante Bleed score, la disnea se evaluó mediante el score de Borg mientras que el score de DAPT se utilizó para determinar el beneficio de la prolongación de terapia antiplaquetaria dual (**Figura 14**).

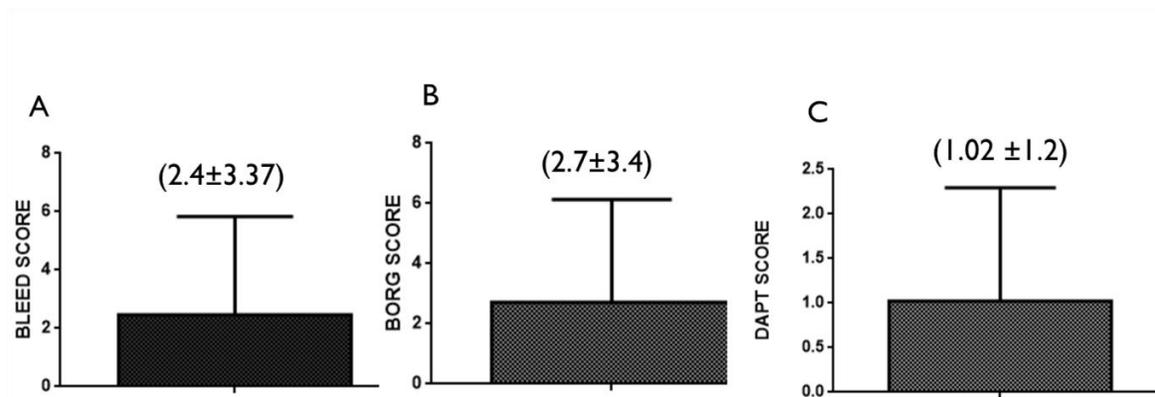


Figura 14. Scores de valoración clínica.

A) Sangrado: Bleed score, B) Escala de presencia y severidad de disnea: Borg score, C) Beneficio de prolongación de terapia antiplaquetaria dual: DAPT score.

RELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Se analizó el genotipo de 34 de los pacientes de los cuales se pudo obtener ADN de calidad adecuada para la genotipificación. Se analizó la frecuencia alélica y genotípica de la población se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas para rs6809699, rs6785930 y rs2046934.

VARIABLE	ESTADÍSTICOS		GENOTIPO		
	ALELO ABR	AAR	HAA	HET	HAR
rs2046934	T	C	T/T	T/C	C/C
FA(%)	85.29	14.71	73.5	23.5	2.9
rs6809699	G	T	G/G	G/T	T/T
FA(%)	85.48	14.52	67.64	20.5	2.9
rs6785930	C	T	C/C	C/T	T/T
FA(%)	72.06	27.94	55.88	32.35	11.76

Donde: FA, frecuencia alélica; ABR, alelo de bajo riesgo; AAR, alelo de alto riesgo; HAA, homocigoto para el alelo ancestral; HET, heterocigoto; HAR, homocigoto para el alelo de alto riesgo.

Se compararon los valores de agregación plaquetaria en relación al genotipo presentado (HAA, HET y HAR) para los SNP rs6809699, rs6785930 y rs2046934, los resultados se resumen en la **Tabla 5**. Los pacientes heterocigotos mostraron

mayor reactividad plaquetaria comparada con los homocigotos (**Figura 15**) ninguno fue estadísticamente significativo (**Tabla 7**).

Tabla 6. Comparación de agregación plaquetaria y la presencia de los SNP. Se utilizó prueba estadística Kruskal Wallis.

Variable	Estadísticos	Estadísticos			P
		HAA	HET	HAR	
rs2046934 (N=34)	N(%)	25(73.5)	8(23.5)	1(2.9)	0.568
	Promedio(SD)	27.64(25.14)	35.87(37.88)	6.00	
	Error Típ.	5.70	10.08	28.52	
rs6809699 (N=31)	N(%)	23(67.64)	7(20.5)	1(2.9)	0.377
	Promedio(SD)	26.56(24.97)	45.28(39.21)	6.00	
	Error Típ.	5.97	10.82	28.62	
rs6785930 (N=34)	N(%)	19(55.88)	11(32.35)	4(11.76)	0.088
	Promedio(SD)	31.42(30.98)	33.09(25.20)	5.75(4.85)	
	Error Típ.	6.34	8.33	13.82	

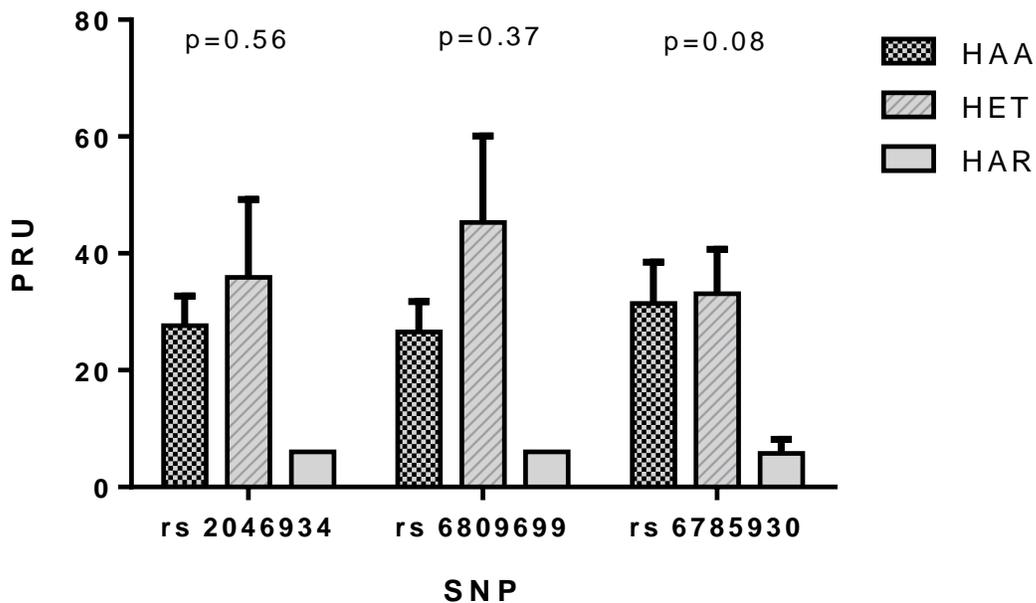


Figura 15. Comparación agregación plaquetaria y genotipo presentado.

Los valores de p fueron calculados usando prueba prueba estadística Kruskal Wallis.

Tabla 7. Comparación de agregación plaquetaria y genotipo de polimorfismos (Modelo Lineal General).

Variable	Estadísticos	HAA vs HET	HET vs HAR	HAA vs HAR	P
rs2046934	Sig. Tendencia lineal	0.483	0.331	0.462	0.462
rs6809699	Sig. Tendencia lineal	0.141	0.210	0.488	0.488
rs6785930	Sig. Tendencia lineal	0.874	0.100	0.102	0.102

La dinámica plaquetaria presentado con cada genotipo (HAA, HET, HAR) se evaluó mediante el delta de cambio de PRU basal y PRU alcanzado bajo el efecto del fármaco (**Figura 16**).

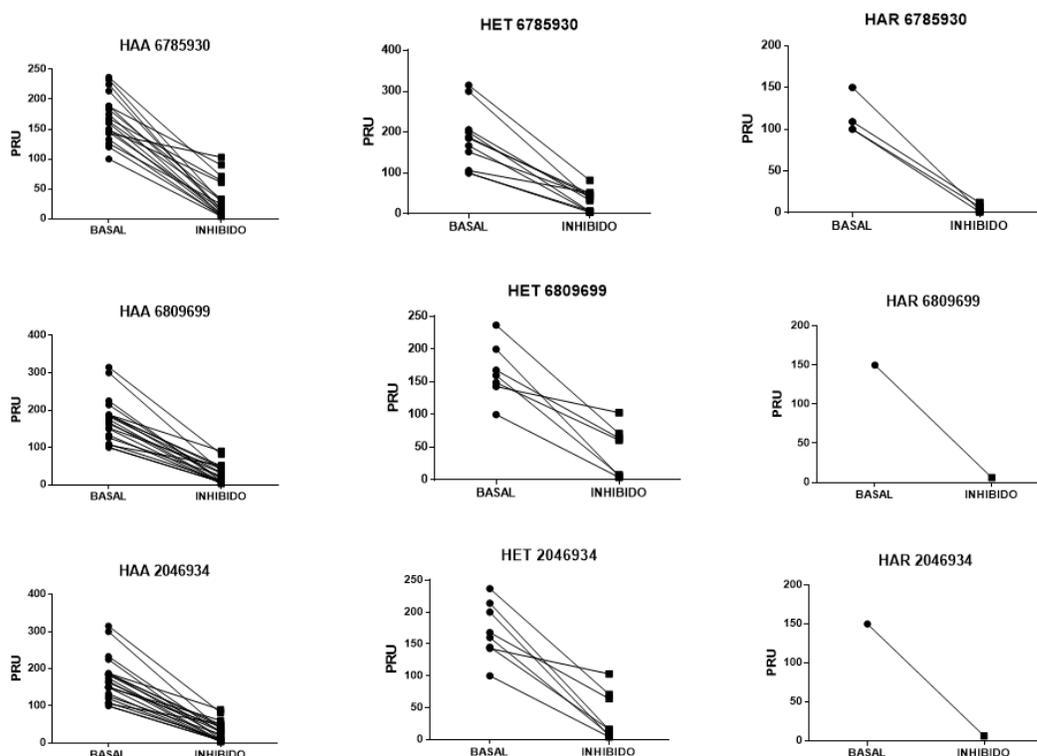


Figura 16. Delta de agregación plaquetaria de PRU basales a PRU con inhibición del fármaco para cada genotipo.

Se compararon los valores de agregación plaquetaria de acuerdo a la presencia de los alelos de alto riesgo, se dividió a los pacientes en dos subgrupos mutuamente excluyentes: ABR: HAA vs AAR: HET y HAR agrupados se utilizó la prueba de prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para muestras independientes

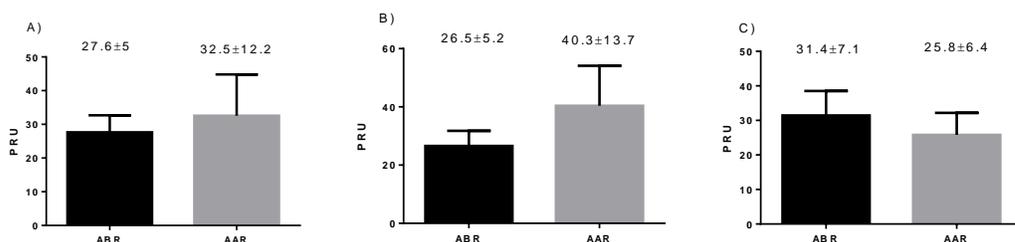


Figura 17. Comparación agregación plaquetaria en relación a presencia de alelo de alto riesgo.

PRU expresadas en Promedio±SEM. Los valores de p fueron calculados usando la prueba estadística Mann-Whitney-Wilcoxon para muestras independientes ABR vs AAR. **A)** rs2046934, p= 0.902. **B)** rs6809699, p= 0.512. **C)** rs6785930, p= 0.498

Los pacientes fueron agrupados dependiendo la presencia de los alelos de la siguiente manera:

- a) Grupo 0: ABR para los 3 SNP
- b) Grupo 1: AAR de 1 SNP
- c) Grupo 2: AAR de ≥ 2 SNP

La agregación plaquetaria fue mayor en el grupo de portadores ≥ 2 alelos de alto riesgo **Tabla 8** y **Figura 18**; sin significancia estadística (**Tabla 9**).

Tabla 8. Comparación de agregación plaquetaria en relación al número de SNP presentados .

ESTADÍSTICOS				
	GRUPO 0	GRUPO 1	GRUPO 2	P
N	10	17	7	0.661
Promedio(SD)	24.90(25.34)	27.82(24.50)	37.42(41.01)	
SEM	9.0	6.9	10.8	

Tabla 9. Comparación de agregación plaquetaria en relación al número de SNP presentados.

ESTADÍSTICOS			
	GRUPO 0 vs GRUPO 1	GRUPO 0 vs GRUPO 2	GRUPO 1 vs GRUPO 2
VALOR DE P	0.8	0.38	0.46
P DE TENDENCIA LINEAL			0.647

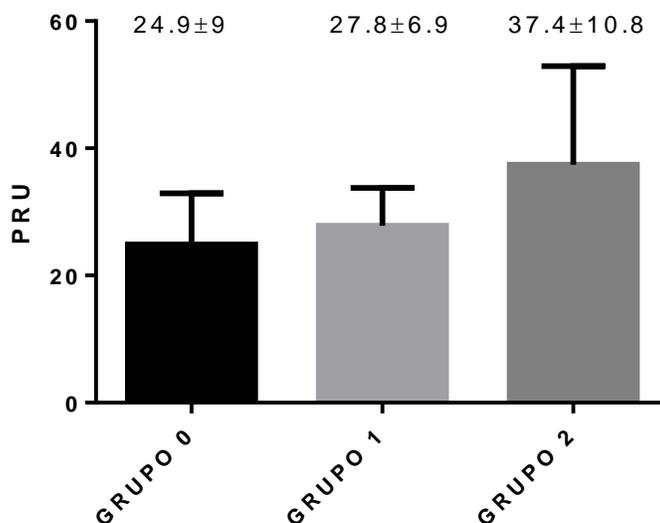


Figura 18. Comparación de agregación plaquetaria en relación al número de SNP.

PRU expresadas en Promedio ± SEM. P de tendencia lineal 0.382

DISCUSIÓN

El ticagrelor se diseñó para superar las desventajas de sus predecesores (tienopiridinas) al no ser un profármaco y no necesitar pasos metabólicos para activarse. Esto permitió solucionar el problema de pacientes resistentes al tratamiento que reportaban un mayor riesgo de sufrir un nuevo evento isquémico. Sin embargo como se muestra en la **Figura 5** sigue existiendo una alta variabilidad en la respuesta al nuevo fármaco.

En cuanto a las características demográficas basales de nuestra población (**Tabla 3**), se encontró una proporción mayor de género masculino (76.7%) que se ajusta a lo reportado a nivel mundial, así mismo encontramos una alta proporción de pacientes con factores de riesgo cardiovasculares: tabaquismo (11.6%), diabéticos

(30.2%), hipertensión arterial sistémica (55.8%) y dislipidemia (55.8%). La presentación clínica fue predominantemente como infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST.

Ninguno de los pacientes analizados fue detectado con perfil de alto riesgo para eventos isquémicos por agregometría definido como >208 PRU sin embargo se observó una variabilidad de respuesta importante, los estudios clínicos internacionales reportan que a pesar de su mayor potencia, la frecuencia de hemorragia mayor es similar a la observada con fármacos menos potentes, pese a ello las nuevas recomendaciones indican un perfil de riesgo de sangrado con PRU <85 , la mayoría de los pacientes presentan un valor de PRU por debajo de este valor, solo 3 pacientes se encuentran en valores de agregometría plaquetaria de perfil de seguridad (**Figura 6**). Se apreció una disminución estadísticamente significativa $p=0.002$ obtenida posterior a la administración del fármaco con un delta de cambio (**Figura 5**). El delta obtenido por el cambio de PRU basal y PRU alcanzado bajo el efecto del fármaco fue de 140.1 ± 49.94 PRU (promedio \pm SD), se observó una alta variabilidad desde un máximo de 264 PRU hasta un mínimo de 40 PRU. Así mismo encontramos una variabilidad en el porcentaje de actividad residual del P2Y₁₂R con un porcentaje máximo de inhibición de 99% y un mínimo de 28%.

Estudios previos han sugerido una mayor agregación plaquetaria y mayor proporción de resistencia al clopidogrel en mujeres (Breet et al. 2011), al comparar la agregación plaquetaria en relación a sus características basales en nuestra población encontramos una mayor reactividad plaquetaria en mujeres 40.40 ± 33.60 PRU's comparado con el género masculino 30.3 ± 29 PRU's (**Figura 7**). Aunque se han descrito diferentes factores que contribuyen el mecanismo fisiológico que explica esta diferencia entre el género permanece poco claro, es importante destacar la influencia hormonal que podría presentarse sin embargo el estatus menopáusico y del ciclo menstrual no se evaluaron, lo cual podría contribuir a explicar estas diferencias.

Dentro de las características basales destacó la correlación de agregabilidad plaquetaria con la edad (**Figura 9**), se observó una tendencia significativa hacia mayor reactividad plaquetar, la edad se ha reportado como predictor independiente de respuesta inadecuada al clopidogrel (Tidjane et al., 2011) la importancia de este hallazgo destaca en que los pacientes ancianos con síndrome coronario agudo (SCA) tienen peor pronóstico que los pacientes más jóvenes, lo que puede deberse, en parte, a una mala respuesta a la terapia antiplaquetaria, especialmente al clopidogrel. A pesar de ser un subgrupo de alto riesgo, los pacientes ancianos son menos propensos a recibir terapias más potentes, tales como el ticagrelor. De hecho, el clopidogrel sigue siendo ampliamente utilizado en esta población en un escenario del mundo real, en nuestra población se demostró el incremento en esta población de riesgo.

La obesidad es un factor de riesgo cardiovascular mayor que se asocia con procesos aterotrombóticos acelerados, se analizó la correlación del IMC con la agregación plaquetaria (**Figura 8**) encontrando un coeficiente de correlación de Spearman $R^2 = -0.066$. En individuos obesos se ha encontrado mayor agregación plaquetaria y mantener mayor reactividad plaquetaria residual ante el tratamiento antitrombótico ya que la obesidad condiciona disfunción plaquetaria mediada por aumento de la cuenta y volumen plaquetario, aumento de leptina en suero, mayor concentración de Ca citosólico en plaquetas, aumento de estrés oxidativo y liberación de citoquinas e interleucinas originadas del tejido adiposo que condicionan una mayor reactividad plaquetaria (Sibbing et al. 2007).

La obesidad en conjunto con dislipidemias son factores que contribuyen al desarrollo de enfermedad cardiovascular por lo que las guías internacionales de prevención secundaria han pautado puntos de corte para cumplir con metas terapéuticas en pacientes de alto riesgo con enfermedad cardiovascular. En nuestra población una gran proporción de pacientes se encontraban fuera de estos valores pese a tratamiento. La acumulación de lípidos oxidados oxLDL puede contribuir a la promoción de activación plaquetaria y condicionar hiperreactividad plaquetaria (Magwensi et al. 2015), dada la naturaleza

heterogénea de las dislipidemias como marcadores de riesgo metabólicos el mecanismo por el que pueden promover la agregación plaquetaria son numerosos entre los que destacan la glicación de LDL que aumenta concentración intracelular de Ca y NO, aumenta contenido de apo e de LDL y su interacción con receptor LDL en plaquetas, el aumento de oxLDL potencia el efecto de los agonistas y da desensibilización de GMP para la señal de inhibición de la activación plaquetaria, la disminución de HDL asociado a disfunción endotelial y disminución de NO (Ferreiro et al. 2010), sin embargo el impacto de los lípidos en la dinámica de agregación plaquetaria aún no es clara ya que esta diferencia está condicionada por características independientes (Menys et al. 1995). En nuestra población no hubo diferencias significativas en los valores de agregación plaquetaria y niveles de lípidos, así mismo tampoco se encontró una correlación entre ellos (**Figura 12** y **Figura 13**).

Se analizaron los valores de agregación plaquetaria en relación a poblaciones consideradas especiales debido a que la fisiopatología de dichas enfermedades condiciona cambios moleculares a nivel plaquetaria de riesgo para eventos cardiovasculares mayores dentro de los que destacó la DM (**Figura 11**). La respuesta inadecuada al clopidogrel es común en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), particularmente si reciben terapia con insulina. Los pacientes diabéticos mostraron una mayor agregación plaquetaria, así mismo aquellos que se encontraban con valores superiores a las metas metabólicas, se observó una correlación positiva entre los valores de glucosa y mayor agregación plaquetar. Estudios previos han definido a la DM como un estado protrombótico mediante diversos cambios plaquetarios como aumentan las moléculas de adhesión, marcadores de activación plaquetaria (CD31, CD49B, CD62P, CD63) aumenta la expresión de receptores de membrana (GPIB, FwW, IIBIIIA, P-selectina, CD40L). Adicional a estos cambios los pacientes diabéticos se asocian a inflamación sistémica y aumento de marcadores de activación plaquetaria y coagulación, así mismo tienen plaquetas reticuladas de mayor tamaño y mayor reactividad medida por liberación total de gránulos (Ferreiro et al. 2010).

En nuestra población encontramos una frecuencia alélica y genotípica para rs6809699, rs6785930 similar a la reportada en estudios previos en nuestro país (**Tabla 1**. Vargas et al. 2014) La frecuencia alélica y genotípica para rs2046934 no ha sido reportada en población mexicana, la distribución genotípica de nuestra población C/C (55.8%), C/T (32.35%) y T/T (11.76%) (Tabla 5) fue más alta a la reportada en estudios de otras poblaciones C/C (77%), C/T (21%) y T/T (2%). (Cuisset et al. 2007).

Los pacientes heterocigotos para los tres SNP mostraron mayor reactividad plaquetaria comparada con los homocigotos para el alelo ancestral (**Figura 15**). Debido a que la muestra fue limitada los pacientes que presentaron alelos de riesgo (Heterocigotos y homocigotos) fueron combinados en un solo grupo para su análisis encontrando que la agregación plaquetaria fue mayor en los pacientes portadores del alelo de riesgo para rs6809699 y rs2046934 no así para rs6785930. El SNP rs2046934 se ha asociado a mayor agregación plaquetaria (Fontana et al. 2003; Zoheir et al. 2013) ajustándose a los hallazgos de este estudio. El SNP rs6785930 se había asociado a mayor proporción de eventos neurológicos isquémicos en pacientes con clopidogrel (Ziegler et al 2005.) sin embargo recientes estudios lo habían asociado a con riesgo de sangrado clínico (Zang et al 2014) en nuestra población mostró una menor agregación plaquetaria que podría orientarnos con lo reportado por Zang et al (2014). El Rs rs6809699 fue asociado por Zang et al. (2014) como posible predictor de sangrado clínico, sin embargo previamente este se había descrito como parte de haplotipo de incremento de agregación plaquetar. Los SNP de P2Y12R se han estudiado ampliamente, algunos estudios han encontrado que su presencia puede modular la respuesta al clopidogrel o afectar el pronóstico de los pacientes (Fontana et al., 2003; Zoheir et al., 2013; Li et al., 2016) sin embargo otros han mostrado resultados negativos a estas conclusiones (Angiolillo et al., 2005; Cuisset et al., 2007). Al realizar el sub análisis encontramos que los pacientes que presentaban dos de los alelos de riesgo mostraban mayor agregación plaquetaria que los otros grupos indicándonos que la coexistencia de diferentes alelos de riesgo podría contribuir a la mayor agregación plaquetaria presentada por los pacientes más allá de la presencia de

un solo SNP. Los SNP elegidos (rs6809699, rs2046934, rs6785930) conforman una variante que posee SNP que están contenidos en la región promotora del gen y en la región codificante que podría indicar que la actividad transcripcional del gen podría ser la alterada en lugar de un cambio per se en la estructura del receptor. Dado la muestra limitada no fue estadísticamente significativo.

En la evaluación clínica se analizaron la incidencia de efectos secundarios del fármaco previamente descritos. Dos pacientes (4.6%) presentaron hiperuricemia diagnosticada por laboratorio y clínicamente significativa. No se reportaron otros efectos secundarios tales como bloqueo auriculoventricular, o deterioro de la función renal.

El ticagrelor está recomendado como primera línea en la terapia antiplaquetaria dual dada su mayor potencia, sin embargo ha presentado una frecuencia más alta de disnea (13.8%) que sus predecesores (7.8% clopidogrel). Estudios recientes indican que la adenosina es disnogénica y sus efectos son mediados por activación de fibras vagales C, el aumento de adenosina extracelular ha sido una de las explicaciones de la disnea presentada en pacientes con tratamiento de ticagrelor ya que este inhibe la recaptura de adenosina al inhibir el transportador equilibrante de nucleósido independiente de sodio ENT1. Con lo cual prolonga la vida media extracelular de la adenosina. En nuestra población el 55.8% (24 pacientes) presentó disnea, cuantificada mediante escala de Borg modificada con una media de 2.4 ± 3.27 categorizada como leve. Tres pacientes requirieron cambio de la medicación a otro agente antiplaquetario debido a la disnea (6,9%). identificaron dos eventos hemorrágicos, ambos considerados de tipo 2 según la definición de BARC.

CONCLUSIÓN

1. En nuestra población el ticagrelor mostró una adecuada inhibición plaquetaria con un perfil de seguridad para eventos isquémicos, aunque presentaron mayormente baja reactividad plaquetaria no presentaron eventos de sangrado mayor.

2. La frecuencia alélica y genotípica en población Queretana con síndrome coronario agudo para el SNP Rs6809699 fue homocigotos para el alelo ancestral C/C(67.6%), heterocigoto T/C(20.5%), Homocigoto para el alelo de alto riesgo T/T(2.9%) y para Rs6785930 fue homocigoto para alelo ancestral G/G (55.8%), heterocigoto T/G (32.3%), homocigoto para el alelo de alto riesgo T/T (11.7%) fue similar a la reportada en población mexicana
3. La frecuencia alélica y genotípica para el SNP Rs2046934 no había sido reportada en población mexicana con anterioridad, por lo que hace este estudio el primero en definirla en México con una distribución: homocigoto para el alelo ancestral T/T (73.5%), heterocigoto T/C (23.5%), Homocigoto para el alelo de alto riesgo C/C (2.9%).
4. Los pacientes heterocigotos de los tres SNP mostraron mayor reactividad plaquetaria comparado comparada con los homocigotos para el alelo ancestral sin significancia estadística.
5. La agregación plaquetaria fue mayor en los pacientes portadores del alelo de riesgo para rs6809699 y rs2046934 no así para rs6785930. Los pacientes con coexistencia de dos o más alelos de riesgo muestran una tendencia numérica a mayor agregación plaquetaria. Dado la muestra limitada no fue estadísticamente significativo
6. Aunque la disnea presentada fue predominantemente leve y transitoria en la mayoría de los pacientes la incidencia elevada de esta hace necesario un mayor estudio en esta población.

BIBLIOGRAFÍA

- Amsterdam EA, Wenger N, Brindis RG, et al. 2014 AHA/ACC Guidelines for the management of patients with non-ST elevation coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:2645-2687
- Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, et al. Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life*. 2004;56:13-8.
- Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thromb Res*. 2005;116:491–7.
- Angiolillo DJ, Ferreiro JL. Inhibición del receptor plaquetario P2Y12 de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63:60-76.
- Angiolillo DJ, Gibson CM, Cheng S, et al. Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: Randomized placebo-controlled crossover comparison studies. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89:65-74
- Attia J, Loannidis J, Thakkinstian A, et al. How to use an article about genetic association: A: Background Concepts. *JAMA*. 2009; 7: 301.
- Bennet JSW. The molecular biology of platelets membrane proteins. *Semin Hematol*. 1990; 27:186-204.
- Bhatt D. Prasugrel in clinical practice. *N Engl J Med* 2009;361:340-342.
- Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle beider Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv Pathol Anat*. 1985;90:261-332.
- Bode C, Huber K. Antiplatelet therapy in percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2008;10:A13-A20.
- Bonfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia and atherosclerosis. *Cell Metab*. 2011;14:575-585

- Breet N; Sluman M; Van Berkel J, Van Werkum H, Bouman A, Harmsze J, Kelder F, Zijlstra C, Hackeng M. Effect of gender difference on platelet reactivity
Neth Heart J (2011) 19:451–457
- Bura A, Bachelot-Loza C, Dali Ali F, et al. Role of the P2Y12 gene polymorphism in platelet responsiveness to clopidogrel in healthy subjects. J Thromb Haemost. 2006;4: 2096–7.
- Caen J, Wu Q. Hageman factor, platelets and polyphosphates: early history and recent connection. J Thromb Haemost. 2010;8:1670-4
- Cattaneo M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. BLOOD. 2011; 117: 2102-2112
- Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. Thromb Haemost. 2001;86:189-197.
- Colombo A, Chieffo A, Frasherri A, et al. Second generation drug-eluting stent implantation followed by 6 versus 12 month dual anti-platelet therapy: The SECURITY Randomized clinical trial. J Am Coll Cardiol. 2014;64:2086-2097
- Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al Role of the T744C polymorphism of the P2Y12 gene on platelet response to a 600-mg loading dose of clopidogrel in 597 patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome Thrombosis Research.2007;120, 893–899
- Davi G. Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. N Eng J Med.2007;357:2482.
- Deeks ED. Ticagrelor. Drugs. 2011;71:909-933.
- Duggan ST, Keating GM. Prasugrel. Drugs. 2009;69:1707-26.
- Ferreiro JL, Gómez-Hospital JA, Angiolillo D. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. Diabetes & Vascular Disease Research. 2010; 7(4) 251–259.
- Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, et al. Platelet activation in unstable coronary disease. N Eng J Med.1986;351:983-989
- Fontana P, Dupont A, Gandrille S, et al. Adenosine Diphosphate-Induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. Circulation. 2003;108:989–95.

- Fontana p, Gaussem P, Aiach M, et al. P2Y12 H2 Haplotype Is Associated With PAD Circulation. 2003;108:2971-2973.
- Fontana P, Gaussem P, Aiach M, et al. P2Y12, H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case–control study. *Circulation*. 2003; 108:2971–3.
- Ford ES, Li C, Zhao G, et al. Trends in the prevalence of low risk factor burden for cardiovascular disease among United States adults. *Circulation*. 2009;120:1181-8.
- Fox KAA, White HD, Gersh BJ et al. Antithrombotic agents: Platelet inhibitors, anticoagulants, fibrinolytics and chronic anticoagulants. *Medical Journal*.2014; 20: 223-228
- Franchi, F. & Angiolillo, D. J. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nature Reviews Cardiology*. 2014; 12,30–47
- Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, et al. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:937-54.
- Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost*. 2001;86: 222-232.
- Galic E, Vrbanic L, Kapitanovic S. P2RY12 Gene Polymorphisms and Effect of Clopidogrel on Platelet Aggregation Coll. *Antropol*. 2013; 37,2: 491–498
- Gibbins JM. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci*. 2004;117:3415-3425.
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Eng J Med*.1987;316:1371-1375.
- Glennon R, Dukat M. Novel serotonergic agents: 5-HT2. *Serotonin ID Research Alert*. 1997;2:107-113.
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:e28-e292.
- Gross PL, Weitz JI. New antithrombotic drugs. *Clin Pharmacol Ther*.2009;86:139-146.
- Grundy SM. *J. Clin Endoc Metab*. 2004,33: 267-282.

- Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol*. 2006;42: s94-100.
- Hulot JS, Collet JP, Montalescot G. Thienopyridine-associated drug-drug interactions: pharmacologic mechanisms and clinical relevance. *Curr Cardiol Rep*. 2011;13:451-458.
- Ibanez B, James S, Agewall S et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation *European Heart Journal*. 2017; 00, 1–66.
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit*. 2005; 19:333-41.
- Jenne CN, Urrutia R, Kub P. Platelets: Bridging hemostasis, inflammation and immunity. *Int J Lab Hem*. 2013;35:254-261
- Johnson GJ. Platelet thromboxane receptors: biology and function Rao G, Ed. *Handbook of platelets physiology and pharmacology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1999; 38-79.
- Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, et al. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2317-26.
- Lai E. Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. *Genome Res*. 2001;11: 927-929.
- Lanas F, Avezum A. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America. The INTERHEART Latin America study. *Circulation*. 2007;115:1067-1074.
- Lewin B. 2008. *Genes IX*. Jones and Bartlett. Toronto, Canadá ISBN: 9780763740634.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
- Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation*. 2000;102:1874-1876.
- Magwenzi S, Woodward C, Wraith K, et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade. *BLOOD*. 2015; 125: 17
- Menys V, Bhatnagar D, Mackness M, Durrington P. Spontaneous platelet aggregation in whole blood is increased in non insulin dependent diabetes mellitus in women but not male patients with primary dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 1995; 112:115-122.

- Mills DC. ADP receptors on platelets. *Thromb Haemost.* 1996; 76:835-856.
- Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuellar J, et al. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation.* 1996; 94:3090.
- Moreno PR. The high-risk thin-cap fibroatheroma: a new kid on the block. *Circ Cardiovasc Interv.* 2009;2:500-2.
- National Center for Biotechnology Information. US National Library of Medicine. P2RY12 purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=64805
- Nierodzki ML, Klepfish A, Karpatkin S. Role of platelet integrin GPIIb-GPIIIa, fibronectina, von Willebrand factor and thrombin n platelet-tumor interaction in vitro and metastasis in vivo. *Semin Hematol.* 1994;31:278-288.
- Oestrich J, Steinhubl S, Ferraris S. Effect of genetic variation in P2Y12 on TRAP-stimulated platelet response in healthy subjects. *J Thromb Thrombolysis.* 2014;38:372-9
- Pandit A, Giri S, Hakim FA, et al. Shorter (<6 months) versus longer (>12 months) duration dual anti-platelet therapy after drug eluting stents: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Cathet Cardiovasc Interv.* 2015;85:34-40.
- Páramo J, García R, Rodríguez P, et al. Antiagregación y anticoagulación en síndromes coronarios agudos: niveles de evidencia. *Rev Med Univ Navarra.* 2007; 51: 23-27
- Plosker GL, Lyseng-Williamson KA. Clopidogrel. *Drugs.* 2007;67:613-646.
- Schneider D, Hardison R, Lopes N. et al. Association Between Increased Platelet P-Selectin Expression and Obesity in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2009; 32:3
- Shiraga M, Miyata S, Kato H, et al. Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 2315–23.

- Shukla SD. Platelet activating factor and platelets. Rao G, Ed. Handbook of platelets physiology and pharmacology. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1999;p:120-141.
- Sibbing D, von Beckerath, O, Schömig, A, Kastrati, A, von Beckerath, N. Impact of Body Mass Index on Platelet Aggregation After Administration of a High Loading Dose of 600 mg of Clopidogrel Before Percutaneous Coronary Intervention *Am J Cardiol* 2007;100:203–205
- Tidjane MA, Voisin S, Lhermusier T, Bongard V, Sié P, Carrié D. More on: Adenosine diphosphate-inducible platelet reactivity shows a pronounced age dependency in the initial phase of antiplatelet therapy with clopidogrel. *J Thromb Haemost.* 2011;9:614–6.
- Valgimigli M, Bueno H, Byrne R et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS *European Heart Journal.* 2017; 0, 1–48
- Vargas A, Ramírez J, de la Peña A, et al. Distribution of ABCB1, CYP3A5, CYP2C19, and P2RY12 gene polymorphisms in a Mexican Mestizos population. *Mol Biol Rep.* 2014;41:7023-9.
- Vargas A. Hernandez D, Villa R. Evaluación de la función plaquetaria con agregometría. *Rev. Hemostasia y trombosis.* 2010;3:29-38
- Vyacheslav A. Korshunov, Stephen M, et al. Vascular remodeling: Hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1722-1728
- Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361:1045-1057.
- Wang X; Lai Y; Luo Y, Zhang X, Zhou H, Zi Y, Tang J, Lui X Relationship between clopidogrel-related polymorphisms and variable platelet reactivity at 1 year: A cohort study from Han Chinese. *J Res Med Sci.* 2016; 21: 111.
- Ware JA, Coller BS. Platelet morphology, biochemistry and function. En: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al. eds. *Williams hematology*, 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1995;p:1161-1201.

- Windecker S, Kolh P, Alfonso A et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*.2014;35:2541–2619
- Yeh RW, Sidney S, Chandra M, et al. Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2010;362:2155-65.
- Zang J, tang x, wang j, et al. The platelet receptor P2Y12 gene polymorphisms and thrombelastography could predict the risk of bleeding events in clopidogrel-treated Chinese patients after percutaneous coronary intervention. *JACC*. 2014; 64:16_S
- Zang J, Yuan J, Meng X, et al. Bleeding Events in Clopidogrel-Treated Patients with STEMI is Associated with a Genetic Risk Score Based on High-Risk Genetic Polymorphisms. *Circulation*. 2014;130: A18093
- Ziegler S, Schillinger M, Funk M, et al. Association of a functional polymorphism in the clopidogrel target receptor gene, P2Y12, and the risk for ischemic cerebrovascular events in patients with peripheral artery disease. *Stroke*. 2005; 36: 1394–9
- Zoheir N, Elhamid A, Abulata N et al. P2Y12 receptor gene polymorphism and antiplatelet effect of clopidogrel in patients with coronary artery disease after coronary stenting. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2013; 0: 1-7

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

¿Por qué se me pide que participe en este estudio?

El propósito de esta hoja de información es explicarle exactamente qué implica participar en el estudio y darle la oportunidad de decidir si desea participar o no. Lea esta hoja de información. El médico del estudio le explicará todo lo que no entienda y responderá todas sus preguntas. No dude en preguntar si quisiera comentar algo más en detalle antes de decidir si acepta participar en el estudio. Su participación es totalmente voluntaria. Si decide participar, firme la Forma de consentimiento informado (FCI) al final de esta Hoja de información. Si decide participar, puede retirar su consentimiento en cualquier momento. Si decide participar y cambia de opinión más adelante, avísele al médico del estudio. Si decide no participar o retirarse del estudio, su atención médica no se verá afectada. Se le proporcionará un duplicado de su aceptación para que se lo lleve a casa y el médico también guardará un duplicado en sus archivos médicos.

¿Cuál es el propósito del estudio?

El propósito de este estudio es aprender más acerca del tratamiento y los resultados inmediatos y a largo plazo en pacientes con la misma afección que usted en un contexto del mundo real, con el fin de determinar las mejores prácticas en el futuro. Se le invita a participar en este registro debido a que se encuentra bajo tratamiento antiplaquetario. Existe una variabilidad en la respuesta al tratamiento antiplaquetario entre pacientes, entre los factores que participan en esta variabilidad se encuentran los factores genéticos, en este estudio se observarán la función plaquetaria en relación a su tratamiento y variantes genéticas asociadas. Este registro es un estudio de observación. Esto significa que se observan prácticas clínicas rutinarias. Cualquier tratamiento administrado sigue la rutina normal y lo deciden usted y su médico tratante. Este estudio no altera ni interfiere con su atención de ninguna manera. Este estudio se revisó y aprobó por un Consejo de Revisión Institucional/Comité de Ética para la

Investigación en Seres Humanos. Este comité es responsable de garantizar que se respeten los derechos de los pacientes de una investigación.

¿Qué tratamiento recibiré?

Si participa en el estudio no se le pedirá que cambie su tratamiento ni su atención. No se le pedirá que realice ninguna visita adicional a su médico ni que se someta a ningún procedimiento adicional. Usted y su médico decidirán el tratamiento más apropiado para controlar su afección de acuerdo con los lineamientos clínicos actuales para los pacientes. Su médico ya le ha explicado, o le explicará con detalles cuando hable con usted, el tipo de tratamiento que necesita. Este estudio únicamente observará su evolución después de que usted y su médico hayan tomado estas decisiones. Su participación en el estudio es completamente voluntaria e independiente de su tratamiento.

¿Qué sucederá si participo?

Como parte del estudio, su médico proporcionará información sobre su salud. Esta información se recopilará al revisar sus antecedentes médicos a partir de sus registros médicos. Alguna información acerca de su evolución se extraerá de sus registros médicos en ciertos puntos cronológicos. Se tomará una muestra de sangre para evaluar la función plaquetaria y una para evaluar el componente genético, (únicamente enfocado a las variaciones genéticas de polimorfismos rs6809699, rs6785930 y rs2046934)

La toma de sangre tiene como posibles riesgos presentación de hematoma, sangrado, infecciones.

¿Existe algún beneficio o algún riesgo por participar en este estudio?

Debido a que el estudio es un registro de observación, no cambiará la forma en que su médico maneja su tratamiento. No existen riesgos, como beneficio obtendrá el estudio para conocer directamente el efecto del tratamiento antiplaquetario sin ningún costo.

Participar en este estudio puede llevar a un mejor entendimiento de su enfermedad y mejorar los métodos para tratar a otros pacientes con la misma afección en el futuro.

Se le informará a usted y/o a su representante legal si ocurre cualquier nuevo hallazgo o cambio significativo en la realización del desarrollo de este estudio que pudiera afectar su disposición a participar o continuar participando.

¿Tendré que pagar o me pagarán por participar en este estudio?

No se le cobrará nada por participar en el estudio y no se le pagará por participar en este estudio.

¿Puedo retirarme del estudio más adelante?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Es libre de rehusarse a participar o de retirarse del estudio en cualquier momento.

Su decisión de retirarse no afectará la atención médica futura que reciba.

¿Cómo se mantendrá la confidencialidad de mi información personal?

Como parte del estudio, se recopilará, analizará e informará de manera encriptada la información médica que usted acepte brindar. Esta información médica incluye sus datos clínicos. Al firmar este documento usted está autorizando al médico y a miembros del personal del estudio a usar esta información en la realización del estudio.

Aunque es posible que los resultados generales de este estudio se divulguen en congresos y en publicaciones, no se revelará su identidad en estas presentaciones. Su nombre no se utilizará de manera alguna en ningún tipo de publicación relacionada con los resultados de este estudio. Solamente su médico conoce su identidad.

En México, su privacidad está protegida por la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, que obliga al responsable o a los terceros involucrados en cualquier etapa del procesamiento de datos personales a mantenerlos confidenciales, obligación que continuará incluso después de finalizar su relación con el propietario o, si corresponde, la persona responsable por lo que el personal de este estudio, aceptan proteger su información personal mediante el

uso y la divulgación de dicha información solo en la medida en que usted lo autorice en esta forma.

FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, el (la) suscrito(a) (nombre, apellido paterno):

.....
He leído la información de este proyecto y acepto participar en el estudio:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS rs6809699, rs6785930 y rs2046934 EN EL RECEPTOR PLAQUETARIO P2Y12 SOBRE LA DINÁMICA DE AGREGACIÓN EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CORONARIA BAJO TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO”

El responsable del proyecto es el Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz adscrito a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro con dirección en Calle Clavel no. 200 Col. Prados de la capilla, Querétaro, Qro. Teléfono (442)192-1200 Ext. 6240. Así mismo, este estudio será realizado por el **Médico General Leslie Marisol Lugo Gavidia**, estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro.

Acepto que use mi información.

He tenido tiempo adecuado para pensar acerca de la información brindada.

He recibido un duplicado de la información para el paciente y de esta forma de consentimiento.

En cualquier momento, si lo deseo, puedo retirarme del estudio sin tener que justificar mis motivos ni sufrir sanciones por hacerlo.

Informaré a mi médico si quiero retirarme del estudio.

En cualquier momento, podría pedir información adicional a mi médico tratante o a un médico delegado por él (ella).

Autorizo el uso y la divulgación de mi información médica en este estudio como se describe en esta forma. Comprendo que mi autorización no caducará, pero que podría revocarla (retirarla) si se lo notifico al médico del estudio por escrito. Por el

presente, autorizo al patrocinador del estudio que guarde, procese y use datos médicos encriptados sobre mi persona en relación con el estudio.

Si el sujeto no sabe firmar, estampará su huella digital y otra persona designada por él/ella o un familiar cercano firmarán en su nombre.

Paciente:	

Nombre	
_____	_____
Firma	Fecha
Representante legal (si corresponde):	

Nombre	
_____	_____
Firma	Fecha
Relación con el participante:	

Médico:

Nombre: _____

Fecha

Firma del médico

Sello del médico,

Dirección y teléfono _____

Los testigos abajo firmantes certifican que han presenciado la explicación de la Forma de consentimiento informado y la obtención del consentimiento, y que a su leal saber y entender el sujeto del estudio ha recibido una explicación completa y detallada y que, además, comprende claramente la naturaleza, los riesgos y los beneficios que conlleva su participación en este estudio.

Testigo n.º 1 (nombre, en letra de imprenta)	Firma	Fecha (dd/mmm/aaaa)
--	-------	---------------------

Relación con el participante

Dirección

Testigo n.º 2 (nombre en letra de imprenta)	Firma	Fecha (dd/mmm/aaaa)
---	-------	---------------------

Relación con el participante

Dirección

Declaro bajo juramento que he recibido un original firmado de este documento (Hoja de información y forma de consentimiento), que se ha llenado y firmado por duplicado

Nombre del paciente, responsable o representante legal:

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha: _____

ANEXO 2

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DNA

1. Agregar: 100µl muestra +500µl Trizol
 - a. Agitar en vortex por 1 min.
 - i. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min
2. Recuperar sobrenadante cuidando tomar la interfase y pasarlo a otro tubo eppendorf
3. Adicionar 1 volumen de cloroformo isoamilico(aprox. 500µl)
 - a. Agitar en vortex por 1 min.
 - i. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min
4. Recuperar sobrenadante cuidando tomar la interfase y pasarlo a otro tubo eppendorf
5. Adicionar 1 volumen de cloroformo isoamilico(aprox. 500µl)
 - a. Agitar en vortex por 1 min.
 - i. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min
6. Recuperar sobrenadante cuidando tomar la interfase y pasarlo a otro tubo eppendorf (aprox 200 µl) agregar 2/3 de isopropanol (aprox 150 µl) y 50 µl de acetato de sodio
7. Dejar toda la noche a -20 °C
 - a. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C
8. Decantar y agregar 1 ml de etanol 70% y mezclar suavemente
 - a. Centrifugar 6,700 rpm por 5 min a 4°C
9. Decantar y agregar 500 µl de etanol 70% y mezclar suavemente
 - a. Centrifugar 6,700 rpm por 5 min a 4°C
10. Decantar y agregar 500 µl de etanol 70% y mezclar suavemente
11. Decantar y dejar secar
12. Resuspender en 50 µl de tris EDTA