

# VARIANTES GENÉTICAS Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN Y EL PRONÓSTICO DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

**Michel Zabalza Cerdeiriña**

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/380894>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Variantes genéticas  
y su relación con la progresión  
y el pronóstico de la cardiopatía isquémica**

**Tesis Doctoral  
Michel Zabalza Cerdeiriña**

**2015**





**TESIS DOCTORAL**

**Variantes genéticas  
y su relación con la progresión  
y el pronóstico de la cardiopatía isquémica**

**Michel Zabalza Cerdeiriña  
2015**

**Ciències Experimentals i Sostenibilitat**

Director: Dr. Roberto Elosua Llanos

Tutor: Dr. Ramon Brugada Terradellas

Memoria presentada para optar al título de Doctor  
por la *Universitat de Girona*





# Citas

*“En principio la investigación necesita más cabezas que medios”*

Severo Ochoa

*“La investigación de las enfermedades ha avanzado tanto que cada vez es más difícil encontrar a alguien que esté completamente sano”*

Aldous Huxley





# Agradecimientos

Esta tesis es el resultado de un trabajo personal y la colaboración de otras personas que han hecho posible su realización y a las que quiero expresar mi gratitud.

A Elena, Berta y Mar por *prestarme* todas estas horas invertidas.

A mis padres y mi hermana por estar siempre presentes y apoyarme incondicionalmente.

A Roberto que apostó por mí y que como director de esta tesis me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica con un interés y una entrega excepcional. Gracias por guiarme en el mundo de la investigación con tanta generosidad y dedicarme tantas horas cuando apenas dispones de ellas.

A Isaac Subirana por ayudarme en múltiples ocasiones con los números.

A Esmeralda Gómez por su gran profesionalidad.

A Joan Sala por su apoyo e interés constante.

A Sandra Farré por su inestimable ayuda final.



# Artículos

La siguiente tesis se presenta en base a una recopilación de 2 artículos científicos escritos y publicados en revistas de investigación médica por el autor de la misma:

## **Artículo 1:**

Zabalza M, Subirana I, Lluís-Ganella C, Sayols-Baixeras S, de Groot E, Arnold R, Cenarro A, Ramos R, Marrugat J, Elosua R. *Asociación entre variantes genéticas de enfermedad coronaria y aterosclerosis subclínica: estudio de asociación y meta-análisis*. Revista Española de Cardiología 2015 Mar 21. pii: S1885-5857(15)00073-0. doi: 10.1016/j.rec.2014.10.023. [Epub ahead of print].

## **Artículo 2:**

Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, Masiá R, Marrugat J, Brugada R, Elosua R. *Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel*. Heart. 2012; 98:100-8

\**Revista Española de Cardiología* tiene un factor de impacto de 3,792 y está clasificada en la posición 34<sup>a</sup> (*segundo cuartil*) entre las 123 revistas de investigación biomédica incluidas en la categoría de Cardiología (©2014 *Journal Citation Reports*, publicado por Thomson Reuters).

\**Heart* tiene un factor de impacto de 6,023 y está clasificada en la posición 12<sup>a</sup> (*primer cuartil y primer decil*) entre las 125 revistas de investigación biomédica incluidas en la categoría de Cardiología (©2014 *Journal Citation Reports*, publicado por Thomson Reuters).



# Índice general

Pág.

## ÍNDICE GENERAL

### LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>1. RESUMEN</b>	<b>14</b>
1.1 - RESUMEN	16
1.2 - RESUM	18
1.3 - SUMMARY	20
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>22</b>
2.1 - CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: MAGNITUD DEL PROBLEMA	24
2.2 - ETIOPATOGENIA DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: LA ATEROSCLEROSIS	25
2.3 - MÉTODOS NO INVASIVOS DE EVALUACIÓN DE PRESENCIA Y PROGRESIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS	30
2.3.1 - TÉCNICAS DE IMAGEN INVASIVAS	30
2.3.2 - TÉCNICAS DE IMAGEN NO INVASIVAS	31
2.3.2.1 - CALCIO EN ARTERIAS CORONARIAS (CAC)	31
2.3.2.2 - VASODILATACIÓN MEDIADA POR FLUJO (VMF)	32
2.3.2.3 - ECOGRAFÍA VASCULAR CON CONTRASTE	32
2.3.2.4 - RMN	33
2.3.2.5 - IMAGEN MOLECULAR	33
2.3.3 - TÉCNICAS NO INVASIVAS UTILIZADAS EN ESTA TESIS	34
2.3.3.1 - GROSOR DE LA ÍNTIMA MEDIA CAROTÍDEA	34
2.3.3.2 - ÍNDICE TOBILLO – BRAZO	36
2.3.3.3 - RIGIDEZ CAROTÍDEA	38
2.4 - GENÉTICA DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA	40
2.4.1 - LA ARQUITECTURA GENÉTICA DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA	40

2.4.2 - UTILIDADES DE LA GENÉTICA EN ENFERMEDADES COMPLEJAS COMO LA CI	42
2.4.2.1 - IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS Y NUEVAS DIANAS TERAPEÚTICAS	43
2.4.2.2 - FARMACOGENÓMICA	44
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
<b>4. ARTÍCULOS</b>	<b>50</b>
4.1 - ARTÍCULO 1: Zabalza M, Subirana I, Lluís-Ganella, C Sayols-Baixeras S, de Groot E, Arnold R, Cenarro A, Ramos R, Marrugat J, Elosua R. <i>Asociación entre variantes genéticas de enfermedad coronaria y aterosclerosis subclínica: estudio de asociación y meta-análisis. Revista Española de Cardiología. 2015 Mar 21. pii: S1885-5857(15)00073-0. doi: 10.1016/j.rec.2014.10.023. [Epub ahead of print]</i>	
4.2 - ARTÍCULO 2: Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, Masiá R, Marrugat J, Brugada R, Elosua R. <i>Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. Heart. 2012 Jan; 98: 100-8</i>	
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
5.1 - VARIANTES GENÉTICAS Y SU RELACIÓN CON LA ATROSCLEROSIS Y SU PROGRESIÓN	74
5.1.1 - FACTORES AMBIENTALES	75
5.1.2 - FACTORES GENÉTICOS	76
5.1.3 - APROXIMACIÓN UTILIZADA EN NUESTRO ESTUDIO	76
5.1.4 - RESULTADOS	77
5.1.5 - LIMITACIONES	
5.1.5.1 - MARCADORES DE ATROSCLEROSIS SUBCLÍNICA UTILIZADOS	78
5.1.5.2 - PROGRESIÓN DE LA ARTERIOSCLEROSIS ÓRGANO-ESPECÍFICA	78
5.1.5.3 - SELECCIÓN DE LAS VARIANTES ANALIZADAS EN ESTA TESIS	79
5.1.6 - IMPLICACIONES	80
5.2 - VARIANTES GENÉTICAS Y SU RELACIÓN CON EL PRONÓSTICO DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL	81
5.2.1 - FACTORES CELULARES	81
5.2.2 - FACTORES CLÍNICOS	82
5.2.3 - FACTORES GENÉTICOS	84

5.2.4 - APROXIMACIÓN UTILIZADA EN NUESTRO ESTUDIO	85
5.2.5 - RESULTADOS	86
5.2.6 - LIMITACIONES	88
5.2.7 - IMPLICACIONES	88
5.3 - PERSPECTIVAS FUTURAS	90
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>92</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>96</b>





# Listado de abreviaturas

CAC	Calcio en arterias coronarias
CI	Cardiopatía isquémica
FRCV	Factor de riesgo cardiovascular
GIMc	Grosor de la íntima media carotídea
GWAS	Estudio de asociación global del genoma ( <i>Genome Wide association study</i> )
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
ITB	Índice tobillo-brazo
IVUS	Estudio con ultrasonido intravascular ( <i>Intravascular Ultra Sound</i> )
LDL	Lipoproteína de baja densidad ( <i>Low density lipoprotein</i> )
OR	Odds ratio
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PCR	Proteína C reactiva
PET	Tomografía por emisión de positrones
RCV	Riesgo cardiovascular
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SCA	Síndrome coronario agudo
SNP	Polimorfismo de nucleótido único ( <i>Single nucleotid polymorphism</i> )
SPECT	Tomografía computerizada por emisión monofotónica
VMF	Vasodilatación mediada por flujo



# RESUMEN

1



## 1.1 RESUMEN

La enfermedad cardiovascular es un trastorno complejo, multifactorial, poligénico y con un importante componente ambiental. Este grupo de enfermedades, y en particular la cardiopatía isquémica, ocasionan una gran morbilidad y mortalidad a nivel poblacional. Por lo tanto, la prevención es un elemento importante en todas las políticas de salud pública.

En la última década se ha avanzado de manera notable en el conocimiento del componente genético de la cardiopatía isquémica y se han descubierto más de 50 loci asociados con el riesgo de presentar esta enfermedad. Muchos de estos loci no se asocian con los factores de riesgo cardiovascular clásicos, y el mecanismo etiopatogénico que explica esta asociación no se conoce. Por otra parte, la variabilidad genética también puede explicar parte de la variabilidad interindividual en la respuesta a diferentes fármacos y asociarse al pronóstico de la enfermedad.

En esta tesis doctoral he analizado la relación entre algunas variantes genéticas asociadas con cardiopatía isquémica, pero no con los factores de riesgo cardiovascular clásicos, y la aterosclerosis subclínica mediante datos propios y un meta-análisis de la evidencia existente. Los resultados de nuestro metanálisis y evidencias de otros estudios sugieren que los genes *CXCL12* y *WDR12* podrían ser buenas dianas terapéuticas para desarrollar fármacos diseñados a estabilizar las placas de arteriosclerosis.

También he analizado si las variantes genéticas del *CYP2C19* determinan la respuesta clínica al tratamiento con clopidogrel en pacientes con cardiopatía isquémica, mediante una revisión sistemática y metanálisis. Nuestros resultados indican que, para considerar la farmacogenética de la respuesta al clopidogrel, no sólo se tienen que tener en cuenta las variantes que indican pérdida de función del *CYP2C19*, sino también aquellas que indican ganancia de función. Nuestros resultados cuestionan la importancia de la variante con pérdida de función *CYP2C19* como asociada con mayor riesgo de acontecimientos cardiovasculares (a excepción de la trombosis del stent). Las variantes con ganancia de función del *CYP2C19* se asocian con menor riesgo de acontecimientos cardiovasculares pero con mayor riesgo de trombosis. Por último, señalar también que los estudios con pequeño tamaño muestral tienden a sobreestimar la magnitud de la asociación, y por lo tanto, en estudios de farmacogenética es necesario diseñar estudios con gran tamaño muestral para obtener estimadores correctos de la magnitud de la asociación.



## 1.2 RESUM

La malaltia cardiovascular és un trastorn complex, multifactorial, poligènic i amb un important component d'influència ambiental. Aquest grup de malalties, i en particular la cardiopatia isquèmica ocasionen una gran morbiditat i mortalitat a nivell poblacional. Per tant, la prevenció és un element important de totes les polítiques de salut pública.

En l'última dècada s'ha avançat de manera notable en el coneixement del component genètic de la cardiopatia isquèmica i s'han descobert més de 50 loci associats amb el risc de presentar aquesta malaltia. Molts d'aquests loci no s'associen amb els factors de risc cardiovascular clàssics, i el mecanisme etiopatogènic que explica aquesta associació no es coneix. D'altra banda, la variabilitat genètica també pot explicar part de la variabilitat interindividual en la resposta a diferents fàrmacs i associar-se al pronòstic de la malaltia.

En aquesta tesi doctoral he analitzat la relació entre algunes variants genètiques associades amb cardiopatia isquèmica, però no amb els factors de risc cardiovascular clàssics i l'aterosclerosi subclínica mitjançant dades pròpies i un meta-anàlisi de l'evidència existent. Els resultats del nostre metanàlisi i evidències d'altres estudis suggereixen que els gens *CXCL12* i *WDR12* podrien ser bones dianes terapèutiques per desenvolupar fàrmacs dissenyats a estabilitzar les plaques d'arteriosclerosi.

També he analitzat si les variants genètiques del *CYP2C19* determinen la resposta clínica al tractament amb clopidogrel en pacients amb cardiopatia isquèmica, mitjançant una revisió sistemàtica i metanàlisi. Els nostres resultats indiquen que per considerar la farmacogenètica de la resposta al clopidogrel no només s'han de tenir en compte les variants que indiquen pèrdua de funció del *CYP2C19* sinó també aquelles que indiquen guany de funció. Els nostres resultats qüestionen la importància de la variant amb pèrdua de funció *CYP2C19* com associada amb major risc d'esdeveniments cardiovasculars (a excepció de la trombosi de l'stent). Les variants amb guany de funció del *CYP2C19* s'associen amb menor risc d'esdeveniments cardiovasculars però amb més risc de trombosi. Finalment, assenyalar també que els estudis amb petita mida mostral tendeixen a sobreestimar la magnitud de l'associació, i per tant, en estudis de farmacogenètica cal dissenyar estudis amb gran grandària mostral per obtenir estimadors correctes de la magnitud de l'associació.





## 1.3 SUMMARY

Cardiovascular disease is a complex, multifactorial, polygenic disorder with an important environmental component. This group of diseases, especially ischemic heart disease, causes significant morbidity and mortality at the population level. Therefore, prevention is a key element of relevant public health policies.

Over the past decade there has been a significant advance in knowledge of the genetic component of ischemic heart disease; more than 50 loci associated with risk for this disease have been discovered. Many of these loci are not associated with traditional cardiovascular risk factors, and the etiopathogenic mechanism that explains this association is unknown. Moreover, genetic variability may explain part of the interindividual variability in response to different drugs and may be associated with prognosis. In this thesis I analyzed the relationship between certain genetic variants associated with ischemic heart disease, but not with the classic cardiovascular risk factors, and with subclinical atherosclerosis, collecting data and carrying out a meta-analysis of the available evidence. The results of this meta-analysis suggest that CXCL12 and WDR12 genes could be good therapeutic targets for drugs designed to stabilize atherosclerotic plaques.

Through a systematic review and meta-analysis, I also examined whether genetic variants of CYP2C19 determine the clinical response to treatment with clopidogrel in patients with ischemic heart disease. The results indicate that the pharmacogenetics of response to clopidogrel must consider not only the variants of CYP2C19 associated with loss of function but also those indicating gain of function. These results question the importance of variant CYP2C19-related loss of function as associated with increased risk of cardiovascular events (except for stent thrombosis). The gain-of-function variants of CYP2C19 are associated with lower risk of cardiovascular events but with increased risk of thrombosis. Finally, we also note that studies with small sample sizes tend to overestimate the magnitude of the association; therefore, pharmacogenetic studies require a large sample size to obtain a correct estimation of the magnitude of the association.



# INTRODUCCIÓN

2



## 2.1 CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: MAGNITUD DEL PROBLEMA

La cardiopatía isquémica (CI) se ha mantenido en los últimos años como la enfermedad con un mayor impacto en la morbilidad y mortalidad mundial<sup>1</sup>, y debido al envejecimiento de la población y a la reducción de su letalidad, la prevalencia está aumentando<sup>2</sup>. La CI sigue siendo la causa de aproximadamente un tercio de todas las muertes de sujetos de edad > 35 años<sup>3</sup>. Se ha estimado que casi la mitad de los varones y un tercio de las mujeres de mediana edad en Estados Unidos sufrirán alguna manifestación de CI a lo largo de su vida<sup>4</sup>.

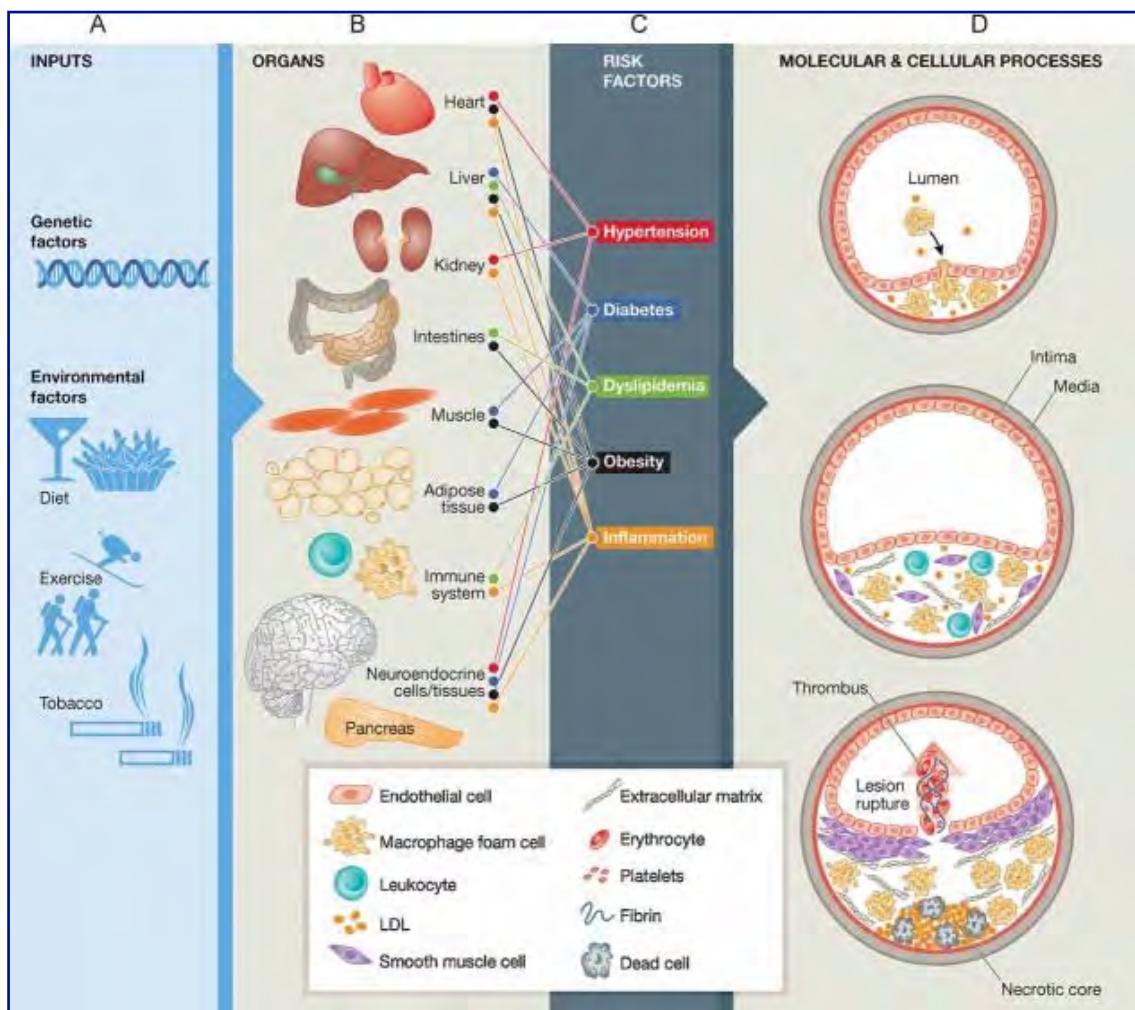
En nuestro entorno, se estima que cada año la enfermedad cardiovascular causa, en total unos 4 millones de fallecimientos en Europa y 1,9 millones en la Unión Europea, la mayor parte por CI<sup>5</sup>, lo que supone un 47% de todas las muertes en Europa y el 40% de la Unión Europea. Todo ello conlleva un coste total estimado de la enfermedad cardiovascular en Europa de 196.000 millones de euros anuales, aproximadamente el 54% de la inversión total en salud, y da lugar a un 24% de las pérdidas en productividad<sup>6</sup>.

En España, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en la población de más de 30 años; de ellas, la CI causa el impacto más importante. Recientemente se ha publicado una estimación de la evolución del número de síndromes coronarios agudos (SCA) en los próximos años en nuestro país, se prevé que en España habrá 109.772 (IC95%, 108.868-110.635) casos de SCA en el año 2021, con una mortalidad a 28 días del 31,1% (34.115 muertes)<sup>2</sup>.

*El conocimiento de la etiopatogenia de la CI puede proporcionar información muy relevante para la prevención primaria de esta enfermedad. Por otra parte, el conocimiento de factores pronósticos en pacientes que ya presentan la CI también puede contribuir a mejorar la calidad de vida y supervivencia de estos pacientes.*

## 2.2 ETIOPATOGENIA DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: LA ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es el principal mecanismo etiopatogénico de la CI y su progresión está relacionada con la interacción entre factores genéticos y ambientales, directamente o a través de factores de riesgo cardiovascular (FRCV) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Etiopatogenia de la aterosclerosis

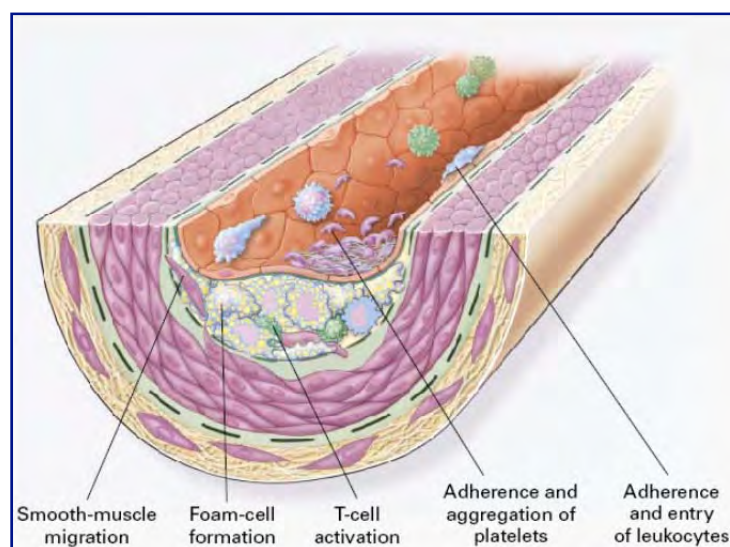
(Ramsey SA et al. EMBO Mol Med 2010;2:79–89)

Es un proceso que se inicia en fases tempranas de la vida y que puede incluso ponerse en marcha durante el desarrollo fetal<sup>7</sup>; aunque los eventos cardiovasculares isquémicos clínicos suelen aparecer después de la quinta década de la vida en los hombres y la sexta década en las mujeres. La aterosclerosis es un proceso crónico, progresivo, caracterizado por la acumulación de lípidos,

elementos fibrosos, células y moléculas inflamatorias en las paredes arteriales<sup>8 9 10 11 12 13</sup>, que puede originar estenosis y limitación del flujo sanguíneo, y en ocasiones, si la placa se rompe, puede desencadenar un proceso trombótico agudo que si ocluye la luz arterial puede ocasionar un acontecimiento cardiovascular agudo, que puede afectar a diferentes órganos o causar una muerte súbita.

Este proceso se inicia con el paso por difusión de la lipoproteína de baja densidad (LDL) del colesterol del torrente sanguíneo al espacio subendotelial, donde puede ser modificada y oxidada por diversos agentes. Las partículas de LDL oxidadas/modificadas son moléculas quimiotácticas potentes que inducen la expresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial, y promueven la adhesión de monocitos y su migración al espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos.

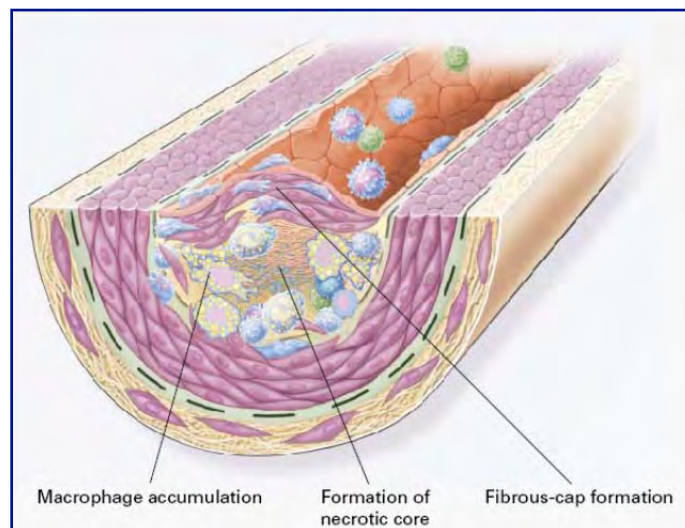
Recientemente, se han identificado diferentes subconjuntos de monocitos con funciones que parecen ser diferentes según la fase de aterosclerosis en la que se involucran<sup>14</sup>. Las partículas de LDL oxidada se unen a los macrófagos a través de receptores *scavenger*, para convertirse en células espumosas. Estas células tienen funciones proinflamatorias, incluyendo la liberación de citocinas, tales como interleucinas y factor de necrosis tumoral. El resultado final de este proceso es la formación de la primera lesión aterosclerótica, *la estría grasa*, en la que las células espumosas están presentes en el espacio subendotelial (**Figura 2**).



**Figura 2.** *Estría grasa*

(Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999; 340:115-26)

Otros tipos de leucocitos, como linfocitos-T y mastocitos, también se van acumulando en el espacio subendotelial<sup>15</sup>. La interacción entre los monocitos, macrófagos, células espumosas y linfocitos-T desencadena una serie de mecanismos de respuesta inmune celular y humoral, y en última instancia un estado inflamatorio crónico con la producción de varias moléculas pro-inflamatorias<sup>16 17</sup>. Este proceso continúa con la migración de células de músculo liso de la capa media de la arteria hacia la íntima<sup>10</sup>. Una vez en la íntima-media, las células musculares producen moléculas de la matriz extracelular, creando una capa fibrosa que cubre la estría grasa original. Las células espumosas en el interior de la matriz fibrosa mueren, y liberan los lípidos que se acumulan en el espacio extracelular, formando un magma rico en lípidos conocido como el core necrótico<sup>18</sup>. El resultado de este proceso es la formación de la segunda lesión aterosclerótica, la *placa fibrosa* (**Figura 3**).

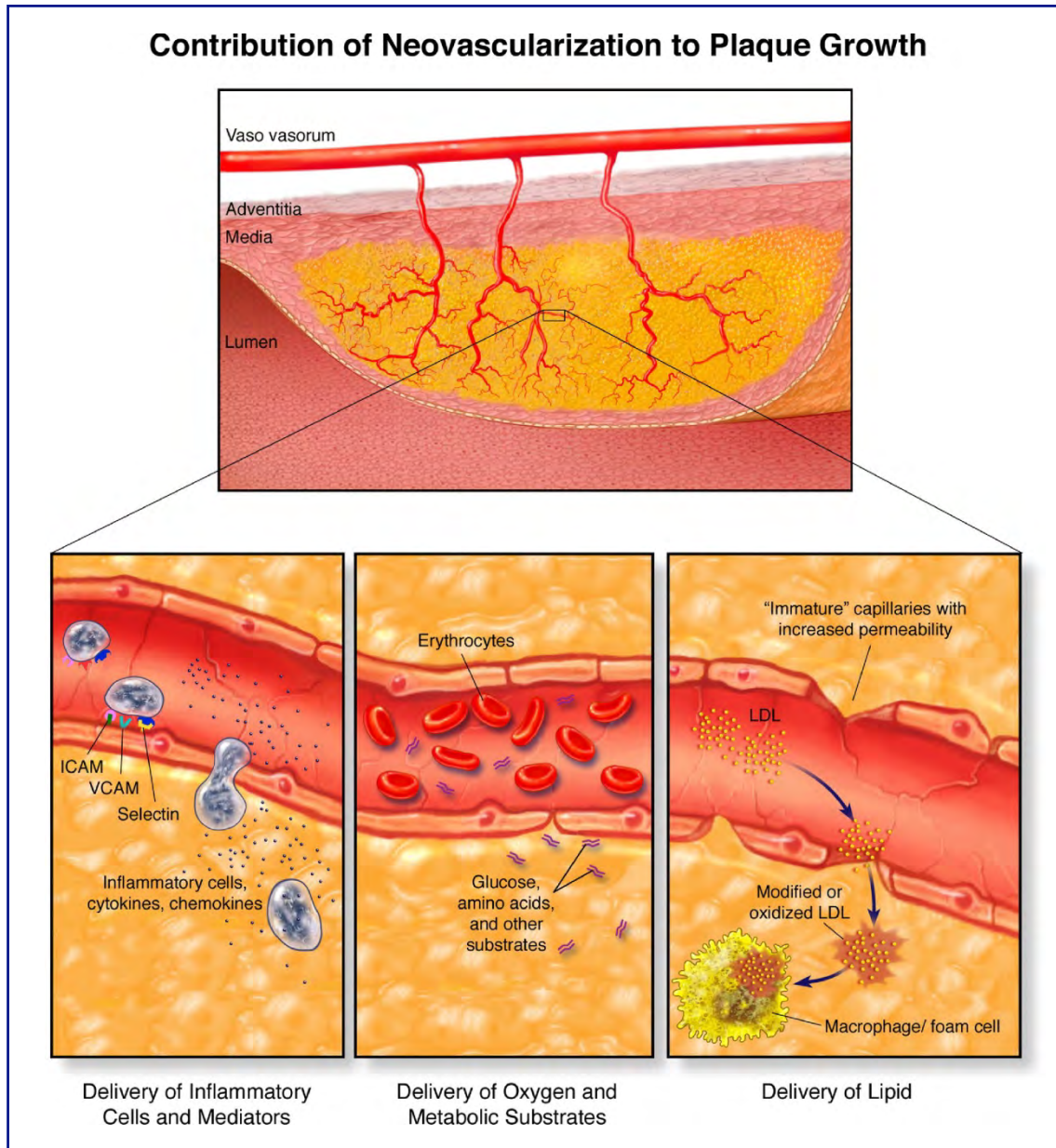


**Figura 3.** *Placa fibrosa*

(Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999; 340:115-26)

La hemorragia intraplaca es también un potencial contribuyente a la progresión de la aterosclerosis, y parece ocurrir cuando el vasa vasorum invade la capa íntima desde la adventicia<sup>19</sup>. En los últimos años se está profundizando en el papel de los vasos de la adventicia y su relevancia en la progresión de la arteriosclerosis mediante el aporte al core de la placa de lípidos, células inflamatorias, citocinas, glucosa, aminoácidos y diferentes sustratos metabólicos que contribuyen al crecimiento y progresión de la placa aterosclerótica (**Figura 4**)<sup>18-20</sup>.





**Figura 4.** *Vasa-vasorum y progresión de la aterosclerosis*

(Doyle B et al. Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis.

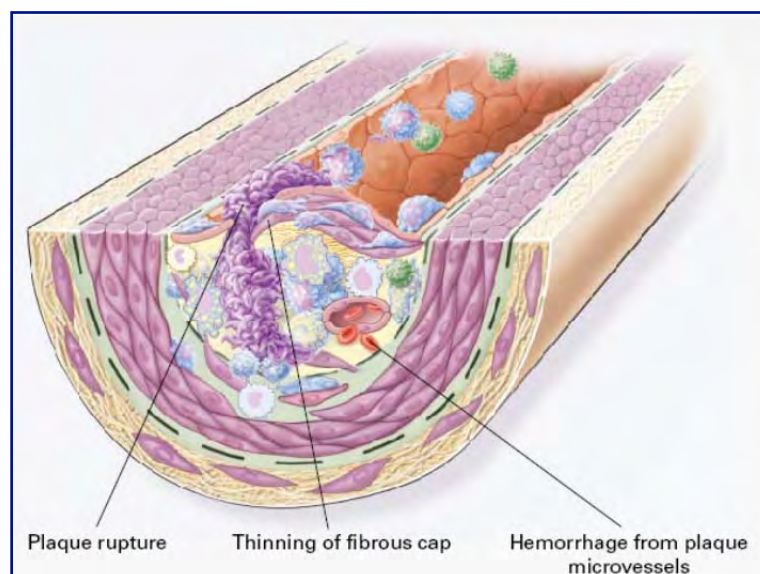
J Am Coll Cardiol. 2007; 49:2073-80)

El espesor de la capa fibrosa es un factor clave para mantener la integridad de la placa aterosclerótica<sup>12</sup>. Se pueden definir dos tipos de placa en función del equilibrio entre la formación y la degradación de esta capa fibrosa: estable e inestable.

Las placas estables tienen un espesor de capa fibrosa intacta, compuesta de células del músculo liso, en una matriz rica en colágeno tipo I y III<sup>21</sup>. La protrusión de este tipo de placa en el

lumen de la arteria puede producir una estenosis de la luz vascular y una limitación de flujo de sangre, lo que puede ocasionar isquemia tisular, sobre todo en situaciones de aumento de demanda de oxígeno como ocurre durante la práctica de actividad física, y por lo general la forma de presentación clínica a nivel miocárdico es la angina estable.

Las placas vulnerables o inestables tienen una capa fibrosa fina compuesta principalmente por colágeno de tipo I y pocas o ninguna células musculares lisas, pero abundantes macrófagos y moléculas proinflamatorias y protrombóticas<sup>13 14 15</sup>. Estas placas son propensas a la erosión o rotura, dejando al descubierto el núcleo de la placa que al ponerse en contacto con las proteínas de la coagulación circulantes, puede causar una trombosis, con oclusión repentina de la luz de la arterial<sup>13 14 15</sup> (**Figura 5**) y un acontecimiento cardiovascular agudo (SCA, ictus isquémico, muerte súbita). En muchas ocasiones estas placas vulnerables no superan el 50% del diámetro de la luz arterial y se sitúan en los segmentos proximales de las arterias coronarias<sup>19</sup>.



**Figura 5.** Rotura de la placa, trombosis y oclusión de la luz arterial.

(Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999; 340:115-26)

En este contexto, *la identificación de los mecanismos que explican la progresión de una placa hacia su estabilidad o vulnerabilidad podrían ser muy útiles para diseñar estrategias preventivas* que contribuyan a reducir la incidencia de acontecimientos cardiovasculares agudos.

## 2.3 MÉTODOS NO INVASIVOS DE EVALUACIÓN DE PRESENCIA Y PROGRESIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una enfermedad difusa que afecta a la mayoría de los lechos arteriales. Por ello, la detección de lesiones en un territorio vascular (p. ej., el carotídeo) pueden indicar la existencia de lesiones en otros territorios menos accesibles a la exploración clínica (p. ej., arterias coronarias).

Por otra parte, diversos estudios patológicos han establecido claramente la asociación entre las lesiones «vulnerables» y la muerte por causa cardiovascular. Por ello, la posibilidad de identificar las características patológicas de las lesiones vulnerables (núcleo lipídico, fina capa fibrosa, gran componente inflamatorio, etc.) aportaría gran valor en la estratificación del riesgo cardiovascular.

Para evaluar la presencia y progresión de la aterosclerosis se pueden usar diferentes técnicas de imagen, que clásicamente se dividen en dos grupos claramente diferenciados en función de su condición: invasivas y no invasivas.

### 2.3.1 TÉCNICAS DE IMAGEN INVASIVAS

Hasta hace pocos años la técnica de imagen considerada como patrón de oro (*gold standard*) en la evaluación de la aterosclerosis coronaria era la coronariografía. Sin embargo, esta técnica únicamente nos informa de la presencia de estenosis que limitan el flujo arterial pero no es útil para detectar placas ateroscleróticas no estenóticas. Actualmente sabemos, que en las fases iniciales de la aterosclerosis se produce un remodelado de la pared arterial con crecimiento de la placa hacia fuera sin protusión al interior de la luz vascular. Es decir, la ausencia de estenosis no es sinónimo de ausencia de aterosclerosis.

La técnica de referencia en la actualidad para evaluar la presencia y las características de la placa aterosclerótica es la ecografía intravascular (IVUS). El IVUS se considera superior a la angiografía coronaria en la detección de la presencia de placa, su caracterización, la cuantificación de la estenosis<sup>22</sup>, la monitorización de la respuesta a diferentes tratamientos y en la evaluación de la progresión/regresión de la placa<sup>23</sup>.

Otras técnicas de reciente aparición son la histología virtual y la tomografía de coherencia óptica que aportan importante información adicional de las características de las lesiones ateroscleróticas<sup>24</sup>. No obstante, la naturaleza invasiva de estas técnicas limita su uso en prevención primaria, y por ello se utilizan las denominadas técnicas de imagen no invasivas.

## 2.3.2 OTRAS TÉCNICAS NO INVASIVAS

### 2.3.2.1 Calcio en arterias coronarias (CAC)

La detección de CAC es un marcador indirecto de aterosclerosis coronaria, y ofrece información diagnóstica y pronóstica independientemente del sexo y la raza<sup>25 26</sup>. Es una técnica rápida y altamente reproducible, pero su uso está limitado por su coste, su disponibilidad y el uso de radiaciones ionizantes.

La presencia de calcio se asocia con la incidencia de acontecimientos coronarios, incluso tras ajustar por FRCV. Sin embargo, la ausencia de CAC no excluye la presencia de placa no calcificada<sup>27</sup>. En la población asintomática, un score de 0 se asocia con bajo riesgo<sup>28</sup>, pero en la población sintomática con evidencia clínica de isquemia miocárdica, un CAC de 0 puede asociarse con una tasa de eventos anual de hasta el 3,6%<sup>29 30</sup> relacionada con la presencia de lesiones no calcificadas. La tasa de progresión de CAC a lo largo del tiempo se correlaciona con la progresión de aterosclerosis y puede mejorar la predicción de eventos cardiovasculares futuros<sup>31</sup>. Varios estudios han demostrado una mejora en la predicción en individuos con riesgo cardiovascular intermedio<sup>32 33</sup>. Algunos estudios han comparado la capacidad predictiva del CAC y de la ecografía carotídea, y los resultados indican que el CAC tiene una mejor capacidad predictiva de acontecimientos coronarios que el grosor de la íntima-media carotídea (GIMc), pero ambas exploraciones presentan una similar capacidad predictiva de acontecimientos cerebrovasculares<sup>34 35</sup>.

Sin embargo, las reducciones intensas de colesterol LDL con estatinas no se correlacionan con una disminución en CAC, como evidenció el estudio BELLES<sup>36</sup>.

Las guías europeas incluyen la detección de CAC como una técnica que se puede utilizar en adultos asintomáticos con riesgo cardiovascular intermedio para su mejor estratificación (recomendación IIa, nivel de evidencia B)<sup>39</sup>, del mismo modo que las guías americanas (recomendación IIb, nivel de evidencia B)<sup>40</sup>.

### 2.3.2.2 *Función endotelial: vasodilatación mediada por flujo (VMF)*

Es una medida de la función endotelial que se suele realizar en la arterial humeral o radial, y que de forma indirecta puede reflejar la funcionalidad a nivel de las arterias coronarias<sup>37</sup>. Esta prueba se basa en la liberación endotelial de óxido nítrico y otros factores relajantes derivados del endotelio, en respuesta a un aumento de la fuerza de cizallamiento tangencial. En esta prueba esto se produce cuando el flujo sanguíneo del antebrazo aumenta durante la hiperemia reactiva que sigue a un breve período de isquemia transitoria en los territorios distales. La isquemia se produce mediante un manguito neumático, colocado en el antebrazo, distalmente a la zona de visualización mediante ecografía, e hinchado a una presión suprasistólica durante 5 min. Al deshinchar el manguito, el aumento del flujo da lugar a una fuerza tangencial, que activa la eNOS para que libere óxido nítrico a través de la vía de la L-arginina. El óxido nítrico se difunde a las células de músculo liso y causa su relajación, lo que conduce a vasodilatación. Finalmente, se mide la VMF como porcentaje de cambio del diámetro de la arteria humeral entre la situación basal y el aumento máximo del diámetro<sup>38</sup>. La VMF se correlaciona moderadamente con el GIMc<sup>39</sup>. Asimismo, numerosos fármacos que reducen el riesgo cardiovascular han demostrado reversibilidad de la disfunción endotelial<sup>40</sup>. Como ventajas destacan su carácter no invasivo y el rápido cambio que experimenta la VMF tras la introducción de un nuevo tratamiento por ello es especialmente útil en ensayos clínicos, pues se obtienen cambios en pocos meses, comparado con años usando el GIMc o los acontecimientos cardiovasculares. Sus principales desventajas son la escasa disponibilidad, la necesidad de técnicos especializados para realizar esta prueba, su amplia variabilidad y la falta de estandarización del método.

En el estudio MESA, la VMF se asociaba con enfermedad cardiovascular de manera independiente, pero no ofrecía incremento de predicción al añadirlo a la función de riesgo de Framingham<sup>41</sup>. Parece que la VMF añade poco a los modelos de predicción de riesgo cardiovascular; en el estudio más positivo para la VMF, tan sólo incrementaba un 1% la capacidad discriminativa del modelo<sup>42</sup>. La VMF no predice enfermedad cardiovascular en pacientes sometidos a coronariografía por dolor torácico (tras un seguimiento de más de 6 años)<sup>43</sup>.

### 2.3.2.3 *Ecografía vascular con contraste*

Consiste en la realización de ecografías, generalmente a nivel de carótidas, con inyección simultánea de contraste. Permite la evaluación del lumen y la morfología de la placa, mejora en la

visualización del GIMc y visualiza directamente vasa vasorum y la neovascularización (placa vasorum, relacionados con placas vulnerables)<sup>44 45</sup>. Si se valida esta técnica en el futuro, podría usarse para detectar la aterosclerosis subclínica y monitorizar la progresión de la enfermedad.

#### 2.3.2.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se trata de una técnica que permite una alta resolución espacial, con una variabilidad intra e interobservador muy pequeña, lo cual permite reducir el tamaño muestral de los estudios. También se ha validado de forma directa con la histología. Proporciona información no sólo sobre el tamaño de la lesión, sino también sobre su composición. Incluso con la ayuda de las nuevas tecnologías se puede identificar inflamación en la pared del vaso, asociada con predisposición a la rotura de lesiones y formación de trombos. Sin embargo, su aplicación a las arterias coronarias sigue siendo limitada, debido a su reducida accesibilidad, pues requiere de centros y personal especializado para su aplicación adecuada. Una de las mayores ventajas de esta técnica radica en que no usa radiación ionizante y permite su uso seriado para valorar intervenciones terapéuticas. Por ejemplo, la RMN ha permitido visualizar la regresión de la placa aterosclerótica carotídea que se produce tras el inicio del tratamiento intensivo con estatinas<sup>46 47 48</sup>. Asimismo, la RMN ha puesto de manifiesto el efecto beneficioso de la combinación de estatinas y niacina frente a estatinas solas en el objetivo primario de reducir la carga aterosclerótica en las carótidas<sup>49</sup>.

#### 2.3.2.5 Imagen molecular

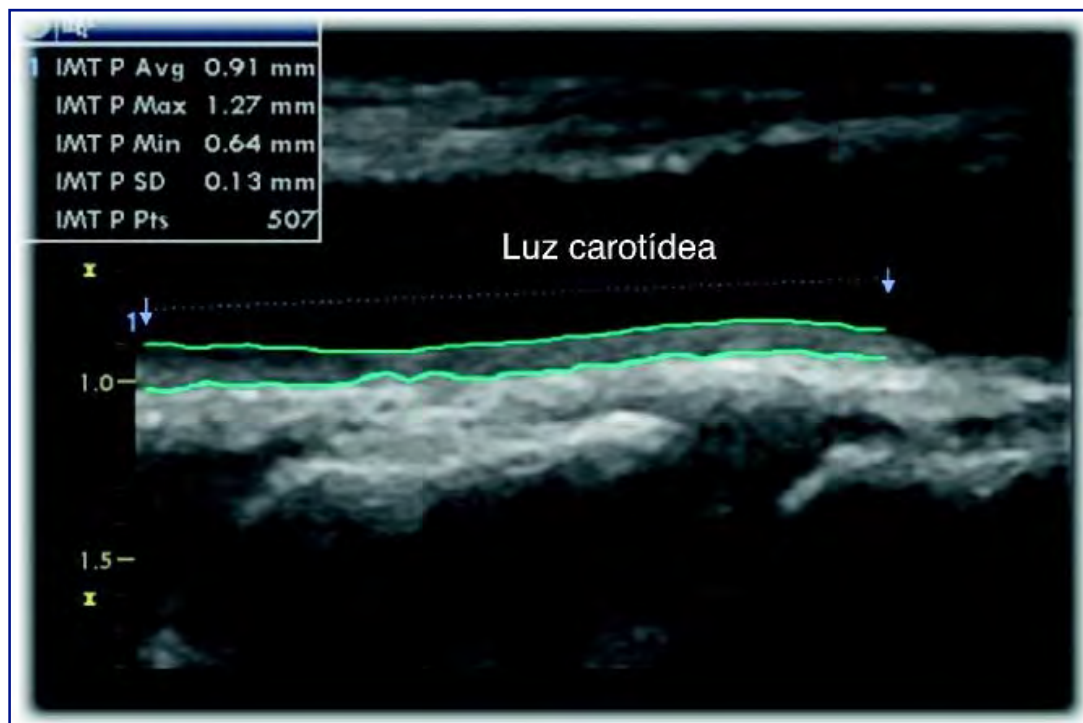
Se basa en la acumulación selectiva de agentes de contraste, muchas veces unidos a péptidos o anticuerpos, en determinadas zonas de la placa y se asume que puede detectar la *actividad* de la lesión. La imagen molecular se puede detectar con la tomografía por emisión de positrones (PET), la tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT) y mediante RMN. Usando SPECT o PET, los radionúclidos, a través de su unión con trazadores (que se unen a componentes de la placa y tienen un rápido aclaramiento), pueden detectar diferentes procesos y componentes moleculares y celulares. Recientemente se están integrando las imágenes de PET (función) y de tomografía computarizada y/o RMN (mayor resolución espacial) para aumentar la información que ofrecen estas técnicas. Todavía en fase experimental, la PET visualiza la inflamación en la placa de ateroma al permitir la marcación selectiva de moléculas de adhesión (como la VCAM1<sup>50</sup>) o metaloproteinasas de matriz<sup>51</sup>. La RMN también permite realizar *imagen molecular*. Se puede unir el agente de contraste a péptidos o anticuerpos específicos para la diana que interese; por ejemplo,

los macrófagos fagocitan las partículas ultrapequeñas de óxido de hierro, lo que permite evaluar la reducción de la actividad inflamatoria en las carótidas tras iniciar tratamiento con estatinas.

### 2.3.3 TÉCNICAS NO INVASIVAS UTILIZADAS EN ESTA TESIS

#### 2.3.3.1 Grosor de la íntima media carotídea (GIMc)

Es una técnica no invasiva, rápida, segura, indolora y que no emite radiaciones ionizantes. El GIMc se mide mediante ultrasonidos en el árbol carotídeo y permite visualizar los límites de la pared arterial a nivel de la carótida común, el bulbo carotídeo o la carótida interna. En la carótida común distal es donde mejor se visualiza y donde ofrece menor variabilidad en la medición. El GIMc se define como la distancia visible entre el lumen de la íntima y la media (**Figura 6**).



**Figura 6.** Grosor íntima-media carotídea

(L.R. Llerena-Rojas et al / Rev Esp Cardiol Supl. 2011; 11:36-44)

Las limitaciones de esta técnica son que sólo evalúa el grosor de la pared arterial, y en algunos casos de la placa de aterosclerosis (en ocasiones también volúmen), pero no su composición, requiere personal entrenado, no es aplicable en las arterias coronarias y tiene variabilidad interobservador<sup>52</sup>. Además, las lesiones o placas ateromatosas se suelen presentar con mayor frecuencia en el bulbo o la carótida interna, territorios que en ocasiones son de difícil acceso y donde las mediciones pueden ser complicadas o no posibles.

El GIMc es un predictor independiente pero moderado de enfermedad coronaria. En varios estudios se ha demostrado la asociación del GIMc con los FRCV y con la incidencia de eventos cardiovasculares<sup>53 54 55</sup>. Concretamente, los resultados de un metaanálisis han mostrado que para una diferencia absoluta del GIMc de 0,1 mm, el riesgo de un futuro infarto de miocardio aumentaba en un 10-15% y el riesgo de ictus un 13-18%.<sup>56</sup>

Sin embargo, diversos estudios de intervención no han demostrado que la reducción del GIMc se correlacione con disminución de la incidencia de enfermedad cardiovascular. No obstante, y probablemente debido a su disponibilidad, se sigue usando frecuentemente como marcador indirecto en estudios prospectivos; incluyendo el análisis de cambios del GIMc como objetivo de eficacia de intervención, lo que permite un tiempo de seguimiento más corto que con objetivos de reducción de eventos clínicos. Ejemplos clásicos son los estudios ARBITER<sup>57 58</sup>, en los que la combinación de niacina y simvastatina ha demostrado regresión de lesiones carotídeas. Sin embargo, la toma de decisiones clínicas y terapéuticas en base a la medición de GIMc y presencia de placa todavía no se ha investigado ni evaluado como objetivo primario en ningún estudio relevante.

El valor añadido que aporta el GIMc en la predicción del riesgo cardiovascular continúa siendo motivo de controversia<sup>59 60</sup>. Varios estudios han analizado la capacidad de discriminación y reclasificación que tiene este parámetro con resultados diversos. Dos estudios europeos (el CAPS y el *Three-City Study*) no observaron una mejora significativa de la capacidad predictiva al incluir el GIMc en los modelos<sup>61 62</sup>. En cambio, un metaanálisis reciente ha mostrado que la evaluación de la placa carotídea aporta mayor exactitud diagnóstica en la predicción del futuro infarto de miocardio<sup>63</sup>. Y en esta línea los resultados del estudio ARIC apuntan a que incluir los valores del GIMc y la presencia de placa carotídea mejora las propiedades predictivas de los modelos respecto al que proporcionan los FRCV clásicos por sí solos<sup>64 65</sup>.

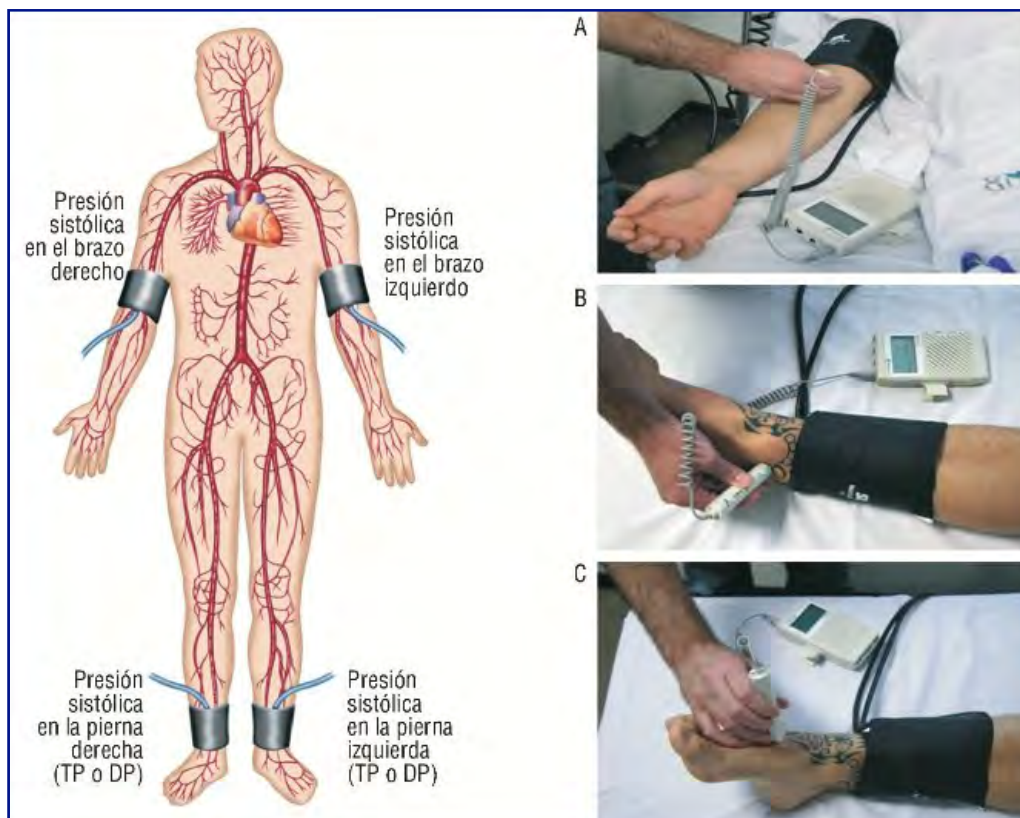
Las guías europeas desaconsejan su utilización en la estratificación del riesgo en la población general, y sólo recomiendan aplicarlo a sujetos con varios FRCV (recomendación IIa, nivel de evidencia B)<sup>66</sup>. Las guías americanas concluyen que la medición rutinaria del GIMc no es recomendable en la práctica clínica para la clasificación de riesgo cardiovascular (recomendación III, nivel de evidencia B)<sup>67</sup>.



En los últimos años también se está estudiando el grosor de la íntima media a nivel de la arteria femoral ya que parece que puede ser un marcador de progresión precoz de la arteriosclerosis<sup>68</sup>.

### 2.3.3.2 Índice tobillo brazo (ITB)

El ITB es el resultado de dividir la presión arterial sistólica (PAS) de cada tobillo (escogiendo el valor más alto de la arteria pedia o la tibial posterior) entre el valor de la PAS de la arteria braquial homolateral (**Figura 7**).



**Figura 7.** Índice tobillo-brazo

(J. Guindo et al Rev Esp Cardiol Supl. 2009; 09:11-17)

Así se obtienen dos valores de ITB, uno para cada lado, seleccionando como definitivo el más bajo de los dos. La determinación es breve, en manos experimentadas la técnica se realiza en unos minutos, es barata, sólo se precisa un esfigmomanómetro y un doppler portátil con sonda de 8 Mhz, y reproducible, con mínima variabilidad intra e interobservador<sup>69</sup>.

Es una prueba que inicialmente se utilizó para el diagnóstico de enfermedad vascular periférica, y que actualmente se ha extendido también a la evaluación del riesgo cardiovascular en

pacientes asintomáticos. La interpretación de los resultados es la siguiente<sup>70</sup>: valores entre 0,9 y 1,4 se consideran normales; los inferiores a 0,9 se consideran indicador de estenosis arteriales con limitación de flujo. Un valor entre 0,4 y 0,9 se considera marcador indirecto de enfermedad vascular periférica moderada, y el inferior a 0,4, de grave. Un ITB > 1,4 es indicativo de presencia de engrosamiento y calcificación de las arterias, especialmente en pacientes con diabetes mellitus.

Un ITB < 0,9 es predictor de riesgo cardiovascular, incluso tras ajustar por los FRCV<sup>71</sup>. Existe una relación en U entre ITB y la mortalidad cardiovascular, de modo que en el Strong Heart Study, tanto un ITB < 0,9 como un ITB > 1,4 aumentaron la mortalidad y enfermedad cardiovascular<sup>72</sup>, incluso tras ajustar por FRCV.

Respecto a la detección de enfermedad coronaria, la revisión sistemática de *Doobay*<sup>73</sup> indica que un ITB < 0,9 tiene una especificidad del 92,7% para predecir ACV y una especificidad del 87,9% para predecir mortalidad cardiovascular (sensibilidades en torno al 16%); por consiguiente, el ITB podría usarse en el cribado cardiovascular teniendo en cuenta que un valor > 0,9 es indicativo de bajo riesgo cardiovascular.

Por otro lado la medición del ITB puede mejorar la capacidad predictiva de las funciones de riesgo cardiovascular<sup>74</sup>, siendo mejor predictor de aterosclerosis que la proteína C reactiva<sup>75</sup>. Un reciente metaanálisis ha mostrado que el ITB modifica de manera importante las categorías de riesgo cardiovascular obtenidos con la función de Framingham-Wilson, y reclasifica adecuadamente a un porcentaje significativo de la población<sup>76</sup>. En nuestro medio también se ha demostrado que el ITB reclasifica a una proporción importante de sujetos hacia la categoría de riesgo alto, sobre todo en mujeres<sup>77</sup>.

Las guías europeas recomiendan medición del índice tobillo-brazo en adultos asintomáticos de riesgo cardiovascular intermedio para mejorar la estratificación del riesgo (recomendación IIa, nivel de evidencia B)<sup>66</sup>. Las guías americanas consideran el ITB como factor de riesgo independiente, y también indican que puede usarse para detectar enfermedad aterosclerótica, de forma complementaria a los a los FRCV clásicos, y especialmente en personas mayores de 50 años con riesgo cardiovascular intermedio o alto (recomendación IIb, nivel de evidencia B)<sup>67</sup>.

### 2.3.3.3 Rigidez arterial o stiffness

La medición ultrasonográfica de la rigidez arterial es un procedimiento sensible que puede resultar más precoz que el GIMc para detectar daño vascular. Una de las desventajas de la medición del GIMc es que sólo permite una estimación local o regional de la pared vascular examinada y algunos autores proponen el empleo de técnicas de ultrasonidos de alta resolución para evaluar los cambios funcionales de la elasticidad arterial inducidos por la aterosclerosis. Por ello, la rigidez arterial se considera un marcador funcional de daño vascular que precede a los cambios estructurales en la pared arterial.

La rigidez arterial puede evaluarse por diversos métodos<sup>78</sup>. Si bien la hipertensión sistólica sola acompañada de un aumento en la presión del pulso en adultos mayores de 50 años constituye un indicador suficiente para establecer el aumento de rigidez de la aorta, se han buscado otras medidas indirectas que permitan diagnosticar la rigidez con mayor precisión. La ultrasonografía doppler ha logrado reproducir la curva del volumen de las arterias periféricas de mediano calibre. Con un transductor de haces paralelos se visualiza, preferentemente de manera transversal, la arteria muscular-elástica (**Figura 8A**) y, mediante software adecuado, se puede medir el movimiento pulsátil, su distensibilidad y el tiempo que tarda el pulso arterial en ir y retornar (**Figura 8B**). A pesar de que existen múltiples medidas específicas de la rigidez arterial, la velocidad de la onda del pulso aórtico es, sin duda, la más estudiada<sup>79</sup>.



**Figura 8A/8B.** Rigidez o stiffness arterial

(L.R. Llerena-Rojas et al / Rev Esp Cardiol Supl. 2011; 11:36-44)

En la población general, se ha demostrado que es un predictor independiente de mortalidad cardiovascular y de incidencia de enfermedad arterial coronaria<sup>80</sup> y cardiovascular<sup>81</sup> durante el seguimiento. Además, diferentes estudios indican que un valor elevado en la medición de la rigidez arterial se relaciona con daño endotelial en los pacientes con hipertensión<sup>82 83</sup>.

La relativa falta de uniformidad en los protocolos de medición, los problemas concernientes a su reproducibilidad y la elevada dependencia del operador son dificultades que impiden la generalización de los resultados encontrados y su utilización en la práctica clínica diaria.

Las guías europeas simplemente mencionan que la rigidez arterial puede ayudar a la estratificación de determinados pacientes sin aportar nivel de evidencia, ni recomendación de su utilización<sup>66</sup>.

Las *técnicas no invasivas utilizadas en esta tesis* proporcionan *información cuantitativa y funcional del impacto de la aterosclerosis* en la pared vascular.

## 2.4 GENÉTICA DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

### 2.4.1 LA ARQUITECTURA GENÉTICA DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

Desde el punto de vista genético, la CI se clasifica como una enfermedad compleja, en la que el riesgo individual viene determinado por múltiples factores genéticos, factores ambientales y la interacción entre ellos. Desde hace años se conoce que existe un componente familiar en la susceptibilidad de padecer enfermedad cardiovascular. Se han realizado estudios con gemelos monocigóticos y estudios epidemiológicos en los que la historia familiar de CI está asociada con la aparición de eventos cardiovasculares. Se estima que la variabilidad genética explica aproximadamente el 40% de la variabilidad del riesgo de presentar una enfermedad cardiovascular a nivel poblacional (heredabilidad). Pero hasta que no se han realizado estudios de asociación global del genoma (GWAS) no se han establecido e identificado asociaciones consistentes entre variantes genéticas y el riesgo de presentar una CI.

Los GWAS son estudios que no están basados en hipótesis previas, que analizan centenares de miles de variantes genéticas y su asociación con diversos fenotipos, y por lo tanto pueden aportar conclusiones que no están limitadas al actual conocimiento fisiopatológico de la enfermedad cardiovascular, y tienen un enorme potencial en la identificación de nuevos mecanismos moleculares que predisponen a CI y nuevas dianas terapéuticas.

En 2007 se publicaron los primeros GWAS para CI<sup>84 85 86</sup>. El principal descubrimiento fue un locus en el cromosoma 9p21<sup>87</sup>, que todavía hoy es el que se asocia de forma más consistente con CI. Estudios posteriores han mostrado que este locus se asocia a un espectro importante de fenotipos vasculares como CI e infarto de miocardio<sup>84 85 86</sup>, calcificación arterial coronaria<sup>88</sup>, enfermedad arterial periférica<sup>89 90</sup> y aneurisma de aorta abdominal<sup>91</sup>.

Hasta la fecha se han identificado más de 50 locus genéticos asociados con CI, y que presentan una magnitud de asociación pequeña con odds ratios (OR) que oscilan entre 1,05 y 1,23 (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Variantes genéticas y locus asociados con CI identificados en estudios de asociación global del genoma. (CARDIoGRAMplusC4D Consortium. Nat Genet 2013; 45:25-33).

rsID	Gen próximo a la variante genética	Chr	Alelo de riesgo/no riesgo (frecuencia del alelo de riesgo)	P-valor	OR
rs602633	<i>SORT1</i>	1	C/A (0,77)	1,47x10 <sup>-25</sup>	1,12
rs17114036	<i>PPAP2B</i>	1	A/G (0,91)	5,80x10 <sup>-12</sup>	1,11
rs4845625	<i>IL6R</i>	1	T/C (0,47)	3,64x10 <sup>-10</sup>	1,09
rs67258870	<i>WDR12</i>	2	C/T (0,11)	1,16x10 <sup>-15</sup>	1,12
rs515135	<i>APOB</i>	2	G/A (0,83)	2,56x10 <sup>-10</sup>	1,03
rs2252641	<i>ZEB2-ACO74093</i>	2	G/A (0,46)	5,30x10 <sup>-8</sup>	1,06
rs1561198	<i>VAMP5-VAMP8- GGCX</i>	2	A/G (0,45)	1,22x10 <sup>-10</sup>	1,07
rs6544713	<i>ABCG5-ABCG8</i>	2	T/C (0,30)	2,12x10 <sup>-9</sup>	0,96
rs9818870	<i>MRAS</i>	3	T/C (0,14)	2,62x10 <sup>-9</sup>	1,07
rs7692387	<i>GUCY1A3</i>	4	G/A (0,81)	2,65x10 <sup>-11</sup>	1,13
rs1878406	<i>EDNRA</i>	4	T/C (0,15)	2,54x10 <sup>-8</sup>	1,09
rs273909	<i>SLC22A4-SLC22A5</i>	5	C/T (0,14)	9,62x10 <sup>-10</sup>	1,11
rs12190287	<i>TCF21</i>	6	C/G (0,59)	4,94x10 <sup>-13</sup>	1,07
rs2048327	<i>SLC22A3-LPAL2-LPA</i>	6	G/A (0,35)	6,86x10 <sup>-11</sup>	1,06
rs9369640	<i>PHACTR1</i>	6	A/C (0,65)	7,53x10 <sup>-22</sup>	1,09
rs10947789	<i>KCKN5</i>	6	T/C (0,76)	9,81x10 <sup>-9</sup>	1,01
rs4252120	<i>PLG</i>	6	T/C (0,73)	4,88x10 <sup>-10</sup>	1,07
rs11556924	<i>ZC3HC1</i>	7	C/T (0,65)	6,74x10 <sup>-17</sup>	1,09
rs2023938	<i>HDAC9</i>	7	G/A (0,10)	4,94x10 <sup>-8</sup>	1,13
rs264	<i>LPL</i>	8	G/A (0,86)	2,88x10 <sup>-9</sup>	1,06
rs2954029	<i>TRIB1</i>	8	A/T (0,55)	4,75x10 <sup>-9</sup>	1,05
rs1333049	<i>CDKN2BAS1</i>	9	C/G (0,47)	1,39x10 <sup>-52</sup>	1,23
rs3217992		9	A/G (0,38)	7,75x10 <sup>-57</sup>	1,16
rs579459	<i>ABO</i>	9	C/T (0,21)	2,66x10 <sup>-8</sup>	1,07
rs12413409	<i>CYP17A1-CNNM2-NT5C2</i>	10	G/A (0,89)	6,26x10 <sup>-8</sup>	1,10
rs2505083	<i>KIAA1462</i>	10	C/T (0,42)	1,35x10 <sup>-11</sup>	1,06
rs501120	<i>CXCL12</i>	10	A/G (0,83)	1,79x10 <sup>-9</sup>	1,07
rs2047009		10	C/A (0,48)	1,59x10 <sup>-9</sup>	1,05
rs974819	<i>PDGFD</i>	11	A/G (0,29)	3,55x10 <sup>-11</sup>	1,07
rs3184504	<i>SH2B3</i>	12	T/C (0,40)	5,44x10 <sup>-11</sup>	1,07
rs4773144	<i>COL4A1-COL4A2</i>	13	G/A (0,42)	1,43x10 <sup>-11</sup>	1,07
rs9515203		13	T/C (0,74)	5,85x10 <sup>-12</sup>	1,08
rs9319428	<i>FLT1</i>	13	A/G (0,32)	7,32x10 <sup>-11</sup>	1,10
rs2895811	<i>HHLPL1</i>	14	C/T (0,43)	4,08x10 <sup>-10</sup>	1,06
rs7173743	<i>ADAMTS7</i>	15	T/C (0,58)	6,74x10 <sup>-13</sup>	1,07
rs17514846	<i>FURIN-FES</i>	15	A/C (0,44)	9,33x10 <sup>-11</sup>	1,04

rs12936587	<i>RAII-PEMT-RASDI</i>	17	G/A (0,59)	$1,24 \times 10^{-9}$	1,06
rs2281727	<i>SMG6</i>	17	C/T (0,36)	$7,83 \times 10^{-9}$	1,05
rs1122608	<i>LDLR</i>	19	G/T (0,76)	$6,33 \times 10^{-14}$	1,10
rs9982601	<i>Gene desert (KCNE2)</i>	21	T/C (0,13)	$7,67 \times 10^{-17}$	1,13

La variabilidad genética en estos loci explica alrededor del 10% de la heredabilidad de la CI<sup>92 93 94 95 96 100 101 102 103</sup>, lo que deja el mayor porcentaje hereditario todavía pendiente de explicar. Asimismo, se ha observado que gran parte de las variantes identificadas no están asociadas con los FRCV clásicos<sup>97 92</sup>.

Algunas de estas variantes, como por ejemplo las localizadas en 1p13.3 y 1q41 se han asociado con eventos cardiovasculares en pacientes con CI establecida (incluido el reingreso y la supervivencia)<sup>98</sup>, y la variación genética en el gen de la trombosmodulina se ha asociado con supervivencia a largo plazo en pacientes que se someten a cirugía de revascularización miocárdica<sup>99</sup>.

Asimismo, existen variantes genéticas que contribuyen a mayor susceptibilidad para muerte súbita en pacientes con CI establecida, como algunos SNPs en los genes *CASQE*, *GPDIL* y *NOSIAP*<sup>100</sup>.

Por lo tanto, la predisposición genética no sólo es relevante para el desarrollo de CI sino también como potencial factor pronóstico en pacientes con la enfermedad ya establecida. Sería de gran importancia de cara al futuro dilucidar qué información genética es útil para tomar decisiones clínicas, e implementar estos conocimientos genéticos en la práctica médica cuando se tratan pacientes con CI.

## 2.4.2 UTILIDADES DE LA GENÉTICA EN ENFERMEDADES COMPLEJAS COMO LA CI

El conocimiento generado sobre la base genética de la CI puede tener diversas aplicaciones y utilidades en la práctica clínica. Entre ellas podemos citar: i) el conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos de la CI y la identificación de nuevas dianas terapéuticas; ii) la identificación de individuos con alto riesgo de presentar acontecimientos clínicos en prevención primaria y secundaria; iii) la evaluación de la relación causal entre un biomarcador y una enfermedad mediante estudios de aleatorización mendeliana; iv) la identificación de individuos respondedores y no

respondedores a un fármaco mediante estudios de farmacogenómica. En esta tesis nos centraremos en la primera y última aplicación, que son las que están relacionadas con los objetivos planteados.

#### *2.4.2.1 Identificación de mecanismos etiopatogénicos y nuevas dianas terapéuticas.*

Los estudios de GWAS han permitido avanzar en el conocimiento de las bases genéticas de la CI<sup>84 86 87 91 97 101 102 103 104</sup>. Algunas de las variantes identificadas se asocian también a los FRCV clásicos, pero esto no ocurre en otras, y los mecanismos biológicos que explican esta asociación continúan sin estar claros. Por ejemplo, el locus 9p21, que es el que se asocia con CI de forma más consistente en los diferentes estudios, está localizado en una región intergénica que codifica un RNA no codificante de proteína (ANRIL) que regula la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, la adhesión celular y la apoptosis, mecanismos que son importantes en la progresión de la aterosclerosis<sup>105 106 107 108</sup>. Este conocimiento puede servir para identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar nuevos fármacos, como por ejemplo los anticuerpos anti-PCSK9<sup>109</sup>, proteína que fue descubierta en estudios genéticos en pacientes con hipercolesterolemia familiar<sup>110</sup>.

Como hemos revisado en el apartado 2.2 de esta tesis la aterosclerosis es el principal mecanismo etiopatogénico de la CI. Empieza con una fase subclínica, que se inicia en una etapa temprana de la vida<sup>7</sup>, y sus manifestaciones clínicas constituyen el estadio final de este proceso crónico. En consecuencia, la medición de las etapas iniciales e intermedias de la aterosclerosis subclínica podría utilizarse para identificar la progresión de este proceso y para predecir el riesgo futuro de sufrir eventos cardiovasculares. El GIMc, la rigidez de la arteria carótida y el ITB son marcadores cuantificables, reproducibles y no invasivos de la aterosclerosis, y constituyen factores predictivos claramente establecidos de los eventos cardiovasculares futuros, como el infarto de miocardio y el ictus<sup>55 74 81</sup>.

El estudio de la *asociación entre la presencia de la aterosclerosis subclínica y los SNP asociados a la CI de manera independiente de los FRCV clásicos* podría contribuir a *esclarecer los mecanismos etiopatogénicos* que subyacen en esta relación.



### 2.4.2.2 Farmacogenómica

En la práctica clínica nos encontramos con que existe variabilidad interindividual en la respuesta a diferentes fármacos. Algunos logran una respuesta deseada a dosis bajas o terapéuticas del fármaco, otros requieren dosis altas, algunos nunca logran la eficacia deseada, y en otros los efectos adversos son más comunes.

Dichas variaciones pueden estar relacionadas por diferencias en la adherencia al tratamiento, o interacciones entre fármacos no reconocidas, aunque cada vez existe un mayor consenso en la idea de que esta variabilidad interindividual también puede estar determinada por factores genéticos. Se considera que las variaciones en el genoma explicarían entre un 20 y un 95% de la variabilidad interindividual tanto en la disponibilidad como en la respuesta a fármacos<sup>111</sup>.

La farmacogenómica estudia la influencia de las variaciones genéticas heredadas o adquiridas en la respuesta a fármacos<sup>112</sup>. Los efectos farmacológicos de la mayoría de los medicamentos son el resultado de una serie de procesos farmacocinéticos (que determinarán la cantidad de medicamento que llega a la biofase) y farmacodinámicos vinculados a la efectividad de la interacción del fármaco con su receptor. La variabilidad de expresión y función de las distintas enzimas involucradas en estos procesos constituye el núcleo principal de estudio de la farmacogenómica. Naturalmente, este análisis no explica la totalidad de la variabilidad de la respuesta terapéutica, sino que se enmarca dentro de las diferencias determinadas por género, edad, alimentación, comorbilidades, factores ambientales e interacciones de medicamentos. Asimismo, la farmacogenómica puede facilitar la identificación de biomarcadores útiles para la selección del fármaco adecuado, la dosis apropiada, el tiempo de tratamiento óptimo o incluso para la prevención de la aparición de efectos adversos<sup>113</sup>.

En la última década, el conocimiento de la farmacogenómica relativa a los fármacos cardiovasculares se ha incrementado significativamente. Un ejemplo bien estudiado es el del *clopidogrel* que presenta una **gran variabilidad interindividual en la respuesta**, y por lo tanto su **análisis farmacogenómico puede ser de utilidad** en pacientes seleccionados, como los que son sometidos a intervenciones coronarias percutáneas y presentan mayor riesgo de trombosis<sup>114</sup>. De este modo sería de utilidad para identificar los pacientes que más se pueden beneficiar de este tratamiento, y **mejorar así el pronóstico de la enfermedad**.



# OBJETIVOS

# 3



3.1 Analizar la relación entre las variantes genéticas asociadas con cardiopatía isquémica, pero no con los factores de riesgo cardiovascular clásicos, y la aterosclerosis subclínica.

3.1.1 Evaluar esta asociación en un estudio de base poblacional utilizando diferentes biomarcadores de aterosclerosis subclínica:

3.1.1.1 Grosor de la íntima-media carotídea.

3.1.1.2 Rigidez carotídea.

3.1.1.3 Índice tobillo-brazo.

3.1.2 Evaluar esta asociación mediante una revisión sistemática y metaanálisis, evaluando posibles causas de heterogeneidad entre estudios.

3.2 Determinar la asociación entre variantes genéticas del gen del citocromo *CYP2C19* y la respuesta clínica al clopidogrel en pacientes con cardiopatía isquémica, mediante una revisión sistemática y metanálisis.

3.2.1 Evaluar la asociación entre las variantes genéticas con ganancia y pérdida de función del *CYP2C19* y la incidencia de nuevos eventos cardiovasculares.

3.2.2 Evaluar la asociación entre las variantes genéticas con ganancia y pérdida de función del *CYP2C19* y el sangrado.

3.2.3 Evaluar la asociación entre las variantes genéticas con ganancia y pérdida de función del *CYP2C19* y la trombosis del stent.

3.2.4 Explorar posibles causas de heterogeneidad entre los estudios.



**ARTÍCULOS****4**





## 4.1 ARTÍCULO 1

Zabalza M, Subirana I, Lluís-Ganella C, Sayols-Baixeras S, de Groot E, Arnold R, Cenarro A, Ramos R, Marrugat J, Elosua R. *Asociación entre variantes genéticas de enfermedad coronaria y aterosclerosis subclínica: estudio de asociación y meta-análisis*. Revista Española de Cardiología 2015 Mar 21. pii: S1885-5857(15)00073-0. doi: 10.1016/j.rec.2014.10.023. [Epub ahead of print].

*Revista Española de Cardiología* tiene un factor de impacto de 3,792 y está clasificada en la posición 34<sup>a</sup> (*segundo cuartil*) entre las 123 revistas de investigación biomédica incluidas en la categoría de Cardiología (©2014 *Journal Citation Reports*, publicado por *Thomson Reuters*).

## Artículo original

## Asociación entre variantes genéticas de enfermedad coronaria y aterosclerosis subclínica: estudio de asociación y metanálisis

Michel Zabalza<sup>a,b,c</sup>, Isaac Subirana<sup>b,d</sup>, Carla Lluís-Ganella<sup>b</sup>, Sergi Sayols-Baixeras<sup>b</sup>, Eric de Groot<sup>e,f</sup>, Roman Arnold<sup>g</sup>, Ana Cenarro<sup>h</sup>, Rafel Ramos<sup>i,c</sup>, Jaume Marrugat<sup>b</sup> y Roberto Elosua<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Josep Trueta, Girona, España<sup>b</sup> Grupo de Epidemiología y Genética Cardiovascular, IMIM (Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas), Barcelona, España<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Girona, Girona, España<sup>d</sup> CIBER de Epidemiología y Salud Pública, Barcelona, España<sup>e</sup> Academic Medical Center, Thoracic Surgery, Amsterdam, Países Bajos<sup>f</sup> Imagedab Online & Cardiovascular, Science Park, Matrix II, 1.08, Amsterdam, Países Bajos<sup>g</sup> ICICOREIAB, Hospital Clínico Universitario, Valladolid, España<sup>h</sup> Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón, Zaragoza, España<sup>i</sup> Unidad de Investigación en Atención Primaria, Institut d'Investigació en Atenció Primària (IDIAP) Jordi Gol, y Unidad Docente de Medicina de Familia de Girona, Institut Català de la Salut (ICS), Girona, España

## Historia del artículo:

Recibido el 6 de octubre de 2014

Aceptado el 29 de octubre de 2014

On-line el 21 de marzo de 2015

## Palabras clave:

Variantes genéticas  
Aterosclerosis  
Grosor intímo-medial carotídeo  
Rigidez carotídea  
Índice tobillo-brazo  
Metanálisis  
Subclínica

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** En estudios recientes se han identificado varias variantes genéticas asociadas a la enfermedad coronaria. Algunas de estas variantes genéticas no se asocian a factores de riesgo cardiovascular clásicos y no están claros los mecanismos por los que se producen tales asociaciones. El objetivo de este estudio es determinar si estas variantes genéticas están relacionadas con la aterosclerosis subclínica medida con el grosor intímo-medial carotídeo, la rigidez carotídea y el índice tobillo-brazo.**Métodos:** Se llevó a cabo un estudio transversal anidado en el seguimiento de la cohorte REGICOR. El estudio se llevó a cabo en 2.667 individuos. Se realizaron mediciones de la aterosclerosis subclínica con métodos estandarizados. Se determinaron los genotipos relativos a nueve variantes genéticas para evaluar las asociaciones con la aterosclerosis subclínica, individualmente y con una puntuación de riesgo genético ponderada. Se llevó a cabo una revisión sistemática y metanálisis de los estudios previos que analizaron esas asociaciones.**Resultados:** Ninguna de las variantes genéticas estudiadas ni la puntuación de riesgo genético mostraron una asociación significativa con la aterosclerosis subclínica. En el metanálisis, el alelo de riesgo del rs1746048 (CXCL12) ( $n = 10.581$ ) mostró asociación directa con el grosor intímo-medial carotídeo ( $\beta = 0,008$ ; intervalo de confianza del 95%, 0,001-0,015), mientras que el alelo de riesgo rs6725887 (WDR12) ( $n = 7.801$ ) mostró asociación inversa ( $\beta = -0,013$ ; intervalo de confianza del 95%, -0,024 a -0,003).**Conclusiones:** Las variantes genéticas analizadas parecen intervenir en la asociación con la enfermedad coronaria por diferentes mecanismos. Estos resultados generan la hipótesis de que la variante CXCL12 parece influir en el riesgo de enfermedad coronaria a través del remodelado y el engrosamiento de las arterias, mientras que la variante de riesgo WDR12 podría estar relacionada con una mayor vulnerabilidad de la placa.

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Association Between Coronary Artery Disease Genetic Variants and Subclinical Atherosclerosis: An Association Study and Meta-analysis

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Recent studies have identified several genetic variants associated with coronary artery disease. Some of these genetic variants are not associated with classical cardiovascular risk factors and the mechanism of such associations is unclear. The aim of the study was to determine whether these genetic variants are related to subclinical atherosclerosis measured by carotid intima media thickness, carotid stiffness, and ankle brachial index.**Methods:** A cross-sectional study nested in the follow-up of the REGICOR cohort was undertaken. The study included 2667 individuals. Subclinical atherosclerosis measurements were performed with

## Keywords:

Genetic variants  
Atherosclerosis  
Carotid intima media thickness  
Carotid stiffness  
Ankle-brachial index  
Meta-analysis  
Subclinical

\* Autor para correspondencia: Grupo de Epidemiología y Genética Cardiovascular, IMIM (Instituto Hospital del Mar de Investigaciones médicas), Dr. Aiguader 8, 08003 Barcelona, España.

Correo electrónico: relosua@imim.es (R. Elosua).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recresp.2014.10.023>

0300-8932/© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

standardized methods. Nine genetic variants were genotyped to assess associations with subclinical atherosclerosis, individually and in a weighted genetic risk score. A systematic review and meta-analysis of previous studies that analyzed these associations was undertaken.

**Results:** Neither the selected genetic variants nor the genetic risk score were significantly associated with subclinical atherosclerosis. In the meta-analysis, the rs1746048 (*CXCL12*;  $n = 10581$ ) risk allele was directly associated with carotid intima-media thickness ( $\beta = 0.008$ ; 95% confidence interval, 0.001-0.015), whereas the rs6725887 (*WDR12*;  $n = 7801$ ) risk allele was inversely associated with this thickness ( $\beta = -0.013$ ; 95% confidence interval, -0.024 to -0.003).

**Conclusions:** The analyzed genetic variants seem to mediate their association with coronary artery disease through different mechanisms. Our results generate the hypothesis that the *CXCL12* variant appears to influence coronary artery disease risk through arterial remodeling and thickening, whereas the *WDR12* risk variant could be related to higher plaque vulnerability.

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

© 2014 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

#### Abreviaturas

EC: enfermedad coronaria  
FRCVc: factores de riesgo cardiovascular clásicos  
GIM: grosor intímomedia  
ITB: índice tobillo-brazo  
SNP: polimorfismos de un solo nucleótido

#### INTRODUCCIÓN

La enfermedad coronaria (EC), que es la principal causa mundial de muerte<sup>1</sup> y discapacidad<sup>2</sup>, tiene un importante componente genético. En estudios recientes de asociación de genoma completo, se han identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociados al infarto de miocardio y la EC<sup>3-11</sup>. Algunas de estas variantes se asocian también a los factores de riesgo cardiovascular clásicos (FRCVc), pero esto no ocurre en otras y los mecanismos biológicos que subyacen a su asociación con la EC siguen sin estar claros.

La aterosclerosis es el principal mecanismo etiopatogénico asociado a la EC. Empieza con una fase subclínica, que se inicia en una etapa temprana de la vida<sup>12</sup>, y sus manifestaciones clínicas constituyen el estadio final de este proceso crónico. En consecuencia, la medición de las etapas iniciales e intermedias de la aterosclerosis subclínica puede utilizarse para identificar la progresión de este proceso y predecir el riesgo futuro de presentar episodios cardiovasculares o coronarios. El grosor intímomedia (GIM), la rigidez de la arteria carótida y el índice tobillo-brazo (ITB) son marcadores de la aterosclerosis exactos, cuantificables, reproducibles y no invasivos y constituyen factores predictivos claramente establecidos de los eventos cardiovasculares futuros, como el infarto de miocardio y el ictus<sup>13-15</sup>.

El estudio de la asociación entre la presencia de aterosclerosis subclínica y la de los SNP asociados a la EC de manera independiente de los FRCVc debería aportar cierta luz sobre los mecanismos biológicos que subyacen a esta relación. Este estudio tiene dos objetivos: a) determinar en un estudio de base poblacional si las variantes genéticas asociadas a la EC pero no a los FRCVc están relacionadas con la aterosclerosis subclínica evaluada mediante el GIM carotídeo, la rigidez carotídea y el ITB, y b) llevar a cabo una revisión sistemática actualizada y un metanálisis de los estudios previos que han analizado estas asociaciones.

#### MÉTODOS

##### Diseño

Se llevó a cabo un estudio transversal anidado en el estudio de cohorte Registre Gironí del Cor (REGICOR)<sup>16,17</sup>. Se utilizaron los datos del seguimiento de dos cohortes de base poblacional, creadas inicialmente en los años 1995 y 2000 (con tasas de respuesta del 72,4 y el 70,0% respectivamente) en ciudades representativas de la diversidad geográfica de la provincia de Girona<sup>16,17</sup>. Durante el periodo 2007-2010, se invitó a los participantes supervivientes no ingresados que residían en esas localidades a acudir a una visita de seguimiento; la tasa de respuesta fue del 78,4%. Se seleccionó a los participantes de entre 35 y 74 años de edad que el momento de los exámenes basales no presentaban enfermedad cardiovascular en ese momento y de cuyo ADN se disponía. El comité ético local aprobó este estudio y los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

##### Selección de las variantes genéticas, determinación del genotipo y generación de la puntuación de riesgo *multilocus*

Se seleccionaron nueve variantes genéticas asociadas a la EC pero no asociadas a los FRCVc: presión arterial, colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad, triglicéridos, diabetes mellitus y tabaquismo. Se generó una puntuación de riesgo genético *multilocus* de la forma descrita con anterioridad<sup>17</sup>. Las primeras siete variantes seleccionadas se asociaron a la EC en estudios de asociación de genoma completo: rs17465637 en *MIA3*, rs6725887 en *WDR12*, rs9818870 en *MRAS*, rs12526453 en *PHACTRI*, rs1333049 cerca de *CDKN2A/2B*, rs1746048 cerca de *CXCL12* y rs9982601 cerca de *SCL5A3*. Se incluyó también la variante rs10455872 en *LPA*<sup>18</sup> y el haplotipo B (rs10507391, rs17216473, rs9315050, rs17222842) en *ALOX5AP*<sup>13</sup>, que se han asociado al riesgo de EC de manera independiente de los FRCVc.

El Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, con base en Madrid, determinó el genotipo en las muestras de ADN usando el chip Cardio inCode (Ferrer inCode; Barcelona, España), que tiene su base en Veracode (Illumina; San Diego, Estados Unidos) y tecnologías KASPar (KBioscience; Hoddesdon, Reino Unido). Se aplicaron criterios de control de calidad tanto a cada una de las muestras como a los SNP seleccionados, incluidos los análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. La coincidencia global del chip con la tecnología de referencia fue del 99,9% y la sensibilidad y la especificidad del método analítico fueron superiores al 98,6%.

Se calculó también una puntuación de riesgo genético *multilocus* para cada individuo mediante la suma del número de alelos de riesgo en las nueve variantes, tras ponderar cada variante con la magnitud estimada de su efecto en el estudio CARDIOGRAM<sup>10</sup> (tabla 1). Las ponderaciones de las variantes de *LPA* y *ALOX5AP* se basaron en los coeficientes descritos en las correspondientes publicaciones<sup>18,19</sup>. Se calculó la puntuación de riesgo genético empleando la siguiente fórmula:

$$GRS = \sum_{i=1}^9 \beta_i \cdot SNP_i$$

Donde:  $\beta_i$  es la magnitud estimada del efecto descrito para cada variante en el estudio CARDIOGRAM o la correspondiente publicación para *LPA* y *ALOX5AP*, y  $SNP_i$  es el número de alelos de riesgo de cada uno de los SNP evaluados (que puede adoptar valores de 0, 1 o 2 para los SNP genotificados).

### Aterosclerosis subclínica

#### Grosor intímo-medial carotídeo

Tres ecografistas titulados evaluaron las exploraciones carotídeas usando un protocolo estandarizado y un equipo de ecografía Acuson XP128 (Acuson-Siemens; Erlangen, Alemania), equipado con un transductor de haz lineal de L7 5–12 MHz. De forma resumida, se examinaron los siguientes segmentos arteriales predefinidos de las arterias coronarias derecha e izquierda: a) la arteria carótida común en una posición 1 cm proximal a la dilatación; b) el bulbo carotídeo, y c) la carótida interna en una posición 1 cm distal a la división del flujo. Se registró una imagen estática de cada segmento arterial como imagen estática DICOM (*digital information and communication in medicine*). Los archivos de imagen se transfirieron a través de un sistema seguro a un laboratorio de interpretación (Imagelabonline; Ámsterdam, Países Bajos). Técnicos específicamente formados y titulados analizaron las imágenes con el programa informático validado «eTrack»<sup>20</sup>. Los técnicos identificaron las interfases con el punto de mira; el programa informático conecta el punto de mira con curvas *spline*. El GIM carotídeo se definió como la distancia media (GIM medio) y la distancia máxima (GIM máximo) entre las interfases luz-intima y media-adventicia en determinado segmento de la pared arterial lejana.

Los resultados de interés fueron: a) el promedio de los GIM medios izquierdo y derecho de las carótidas comunes (GIMacc medio), las arterias carótidas internas (GIMaci medio) y los bulbos carotídeos (GIMbul medio), y b) el valor máximo del GIM de los lados izquierdo y derecho de las arterias carótidas comunes

(GIMacc máximo), las arterias carótidas internas (GIMaci máximo) y los bulbos carotídeos (GIMbul máximo).

Se evaluó la variabilidad interecografistas e intraecografista empleando mediciones repetidas del GIM realizadas a 42 participantes en dos visitas separadas 2 semanas por hasta tres ecografistas. El estudio de la repetibilidad mostró unos coeficientes de correlación intraclassa  $> 0,82$  para el GIMacc medio, tanto para la variabilidad intraecografista como para la interecografistas.

#### Rigidez carotídea

Para la evaluación de la rigidez carotídea, se obtuvo el coeficiente de distensibilidad arterial (CD), definido como el cambio relativo del área de corte transversal por unidad de presión. Durante el examen de ecografía carotídea, se visualizaron en modo B las paredes anterior y posterior de las arterias carótidas comunes derecha e izquierda en la parte distal. Para obtener el registro en modo M de intima-luz de la pared anterior y de luz-intima de la pared posterior, el ecografista pasó del modo B a una imagen de 1/3 modo B y 2/3 modo M de la carótida común en la parte distal. La imagen de 1/3 modo B guía la de modo M. El movimiento de las paredes arteriales en la imagen de 2/3 modo M muestra las formas de onda con los patrones de doble línea de las paredes arteriales a lo largo del tiempo. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa informático validado «eTrack». El programa establece un trazado de las formas de onda de los bordes de avance de las interfases de intima-luz de la pared anterior y de luz-intima de la pared posterior. Si se identifican los contornos de ambas paredes durante al menos dos latidos cardiacos, el programa permite calcular los parámetros del diámetro de la luz y las frecuencias cardiacas. Con base en esta información, se puede obtener otros parámetros de valoración (p. ej., el CD). Se estimó el cambio del diámetro durante el ciclo cardíaco o la distensión ( $\Delta D$ ), y se calculó el CD como sigue<sup>21</sup>:

$$DC = (2\Delta D \cdot D + \Delta D^2) / (\Delta P \cdot D^2)$$

Donde: CD es el coeficiente de distensibilidad,  $\Delta D$  es la distensión, D es el diámetro diastólico y  $\Delta P$  es la presión del pulso (la presión arterial se determinó inmediatamente antes del examen ecográfico).

Se promediaron los valores de CD de las carótidas izquierda y derecha. Si faltaban los datos de modo M de una localización, se utilizaban únicamente los datos disponibles de la otra.

#### Índice tobillo-brazo

Se determinó la presión arterial sistólica en decúbito, después de 5 min en reposo, en la arteria humeral del brazo derecho y las

**Tabla 1**

Algunas variantes genéticas seleccionadas e incluidas en este estudio, ponderaciones asignadas a cada variante, frecuencias de alelos observados y genotipos, datos no disponibles y valor de p para la desviación respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg

Variantes genéticas	Cr	Gen	Ponderación	Riesgo, alelo	Frecuencia del alelo de riesgo	Frecuencia del genotipo	No disponible (%)	H-W
rs17465637	1	MIA3	0,131	C	0,713	AA = 215; AC = 1.061; CC = 1.318	2,7	0,943
rs6725887	2	WDR12	0,131	C	0,143	CC = 45; CT = 642; TT = 1.865	4,3	0,227
rs9818870	3	MRAS	0,113	T	0,133	CC = 1.924; CT = 612; TT = 36	3,5	0,105
rs12526453	6	PHACTR1	0,095	C	0,643	CC = 1.066; CG = 1.181; GG = 327	3,5	0,997
rs1333049	9	CDKN2A/2B	0,254	C	0,512	CC = 682; GC = 1.290; GG = 622	2,6	0,804
rs1746048	10	CXCL12	0	C	0,866	CC = 1.946; TC = 591; TT = 51	2,6	0,435
rs9982601	21	SQ5A3	0,165	T	0,125	CC = 1.964; CT = 574; TT = 34	3,6	0,274
rs10455872	6	LPA	0,285	G	0,081	AA = 2.215; GA = 395; GG = 14	1,6	0,422
Haplotipo B	13	ALOX5AP	0,668	Hap-B	0,236	—	1,9	—

arterias tibial posterior y pedia dorsal de ambas piernas, utilizando un aparato Doppler continuo. Se calculó el ITB derecho e izquierdo mediante el cociente del valor más alto de la presión de la pierna respecto a la presión del brazo, y para el análisis el valor más bajo de los dos cocientes ITB se clasificó como bajo ( $< 0,9$ ), normal ( $0,9-1,3$ ) o alto ( $> 1,3$ )<sup>16</sup>.

#### Otras variables

Realizó los exámenes un equipo de enfermeras y entrevistadores adecuadamente capacitados. Se utilizó una balanza de precisión y de calibrado sencillo para las mediciones de peso y talla, con los participantes en ropa interior y descalzos; se determinó el índice de masa corporal dividiendo el peso en kilos por el cuadrado de la estatura en metros. La presión arterial se determinó con un esfigmomanómetro (OMRON 711) calibrado periódicamente. Se utilizó un manguito apropiado para el tamaño de la parte superior del brazo en cada participante. Las mediciones se hicieron con el paciente sentado tras un reposo de 5 min. Se efectuaron dos lecturas y se registró para el estudio el valor más bajo.

Se utilizaron cuestionarios estandarizados para obtener las variables sociodemográficas y de estilo de vida, así como para los antecedentes previos y los tratamientos de la diabetes mellitus, la hipertensión y la hipercolesterolemia. El tabaquismo actual se definió como un tabaquismo activo durante el año anterior.

Se extrajeron muestras de sangre después de 10-14 h en ayunas. Las concentraciones de colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad y triglicéridos se determinaron con métodos directos (Roche Diagnostics; Basilea, Suiza).

#### Análisis estadístico

Las variables continuas se resumieron mediante la media  $\pm$  desviación estándar o la mediana [intervalo intercuartílico] cuando la distribución se apartaba de la normal, y las variables discretas se presentaron como proporciones.

Para estimar la asociación existente entre las diferentes variantes genéticas y las mediciones de la aterosclerosis subclínica, se utilizaron modelos lineales generales mixtos ajustados por edad y sexo y regresión logística, tomando la encuesta como variable aleatoria.

Se estableció la fase de ALOX5AP haplotipo B empleando los genotipos de los cuatro SNP que definen el haplotipo y la presencia de los alelos AAAG en los SNPs rs10507391, rs17216473, rs9315050 y rs17222842 respectivamente. La determinación de la fase se realizó con la función haplo.em del paquete haplo.stats<sup>22</sup>, y se obtuvo la probabilidad de que hubiera 0, 1 o 2 copias del haplotipo de riesgo en cada muestra individual. Esta probabilidad se añadió a la puntuación de riesgo genético, como con los ocho SNP. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático R (versión 3.0.1)<sup>23</sup>. Para tener en cuenta la realización de comparaciones múltiples, se estableció un valor de  $p$  con corrección de Bonferroni  $< 0,006$  ( $0,05/9$  variantes genéticas independientes =  $0,006$ ) para definir como estadísticamente significativa una diferencia.

#### Revisión sistemática y metanálisis

##### Revisión de la bibliografía

Se siguieron las recomendaciones de la declaración PRISMA para la mejora de la publicación de revisiones sistemáticas y metanálisis<sup>24</sup>. Se definió un protocolo de revisión interna, básicamente con una búsqueda detallada en la base de datos PubMed desde su inicio hasta julio de 2013, para identificar los

estudios que evaluaban la relación entre las variantes genéticas de interés y la aterosclerosis subclínica. La interrogación a la base de datos se hizo con los siguientes términos de búsqueda: («subclinical atherosclerosis» OR «carotid» OR «thickness» OR «stiffness» OR «plaque» OR «ankle-brachial index») y para cada variante genética se añadió también («rs id» OR «gene name»). No se impusieron limitaciones de idioma *a priori*.

Dos revisores independientes (MZ y RE) examinaron manualmente para su selección los artículos identificados mediante esta búsqueda, primero basándose en el título, luego en el resumen y finalmente en el manuscrito completo, para evaluar su idoneidad para la inclusión en el metanálisis. Se examinaron también las referencias bibliográficas citadas en esos artículos para identificar las cifras relevantes no detectadas en la búsqueda inicial.

#### Extracción de los datos

Dos investigadores (MZ y RE) extrajeron los datos de manera independiente: diseño del estudio; variables de valoración evaluadas; características de la cohorte; genotipo(s), frecuencias alélicas y modelo genético utilizado en el análisis; ajuste multivariable, y las estimaciones de las asociaciones. Las discrepancias se resolvieron por consenso.

#### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos del metanálisis se realizaron con la función meta.DSL del paquete rmeta<sup>25</sup>. Se calcularon los coeficientes de regresión lineal globales, los intervalos de confianza del 95% y los valores de  $p$  bilaterales según modelos de efectos aleatorios (DerSimonian y Laird)<sup>26</sup>. Se evaluó la heterogeneidad

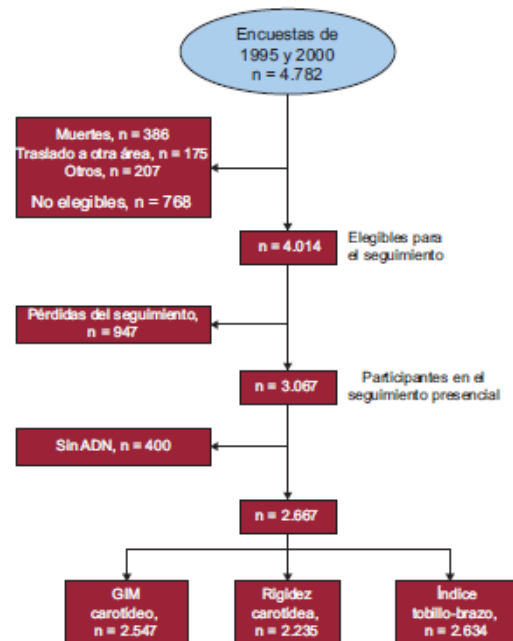


Figura. Diagrama de flujo en el que se muestra el proceso de selección de los participantes en este estudio.

**Tabla 2**

Datos sociodemográficos y principales características clínicas de la muestra total y estratificados según el sexo de los participantes en este estudio

	Total (n = 2.667)	Varones (n = 1.253)	Mujeres (n = 1.414)
Edad (años)	58,8 ± 13,0	58,7 ± 13,2	58,8 ± 12,9
<b>Tabaquismo</b>			
No ha fumado nunca	1.477 (55,3)	423 (33,8)	1.054 (74,2)
Exfumador	718 (27,0)	563 (44,9)	155 (11,3)
Fumador actual	472 (17,7)	267 (21,3)	205 (14,5)
Presión arterial sistólica (mmHg)	129 ± 20	133 ± 19	125 ± 20
Presión arterial diastólica (mmHg)	78 ± 10	81 ± 10	77 ± 10
Hipertensión <sup>a</sup>	1.043 (39,1)	508 (40,5)	535 (37,8)
Tratamiento antihipertensivo	678 (25,4)	341 (27,2)	337 (23,8)
Glucemia (mg/dl)	99 ± 25	104 ± 28	95 ± 22
Diabetes mellitus tipo 2 <sup>b</sup>	348 (13,0)	187 (14,9)	161 (11,4)
Medicación antihipertensiva	178 (6,7)	98 (7,8)	80 (5,7)
Colesterol total (mg/dl)	211 ± 40	207 ± 39	214 ± 41
cHDL (mg/dl)	54 ± 13	49 ± 10	57 ± 13
cLDL (mg/dl)	137 ± 33	136 ± 33	138 ± 34
Triglicéridos (mg/dl)	88 [65-122]	95 [70-130]	83 [61-113]
Dislipemia <sup>c</sup>	1.026 (38,5)	514 (41,0)	512 (36,2)
Tratamiento hipolipemiente	436 (16,3)	222 (17,7)	214 (15,1)
IMC	27,4 ± 4,6	27,6 ± 4,0	27,5 ± 5,0

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; IMC: índice de masa corporal. Los datos expresan n (%), media ± desviación estándar o mediana [intervalo intercuartílico].

<sup>a</sup> La hipertensión se definió como presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg o presión arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg o uso de tratamiento antihipertensivo.

<sup>b</sup> La diabetes mellitus se definió como glucemia en ayunas  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/l) o uso de medicación antihipertensiva.

<sup>c</sup> La dislipemia se definió como cLDL  $> 160$  mg/dl (4,1 mmol/l), cHDL  $\leq 40$  mg/dl (1,0 mmol/l) en varones o  $\leq 50$  mg/dl (1,3 mmol/l) en mujeres o uso de tratamiento hipolipemiente.

de los efectos entre los estudios calculando el parámetro estadístico  $I^2$ .

Cuando los manuscritos definían más de un estudio o población, se consideraron para el metanálisis los resultados de los estudios individuales. Por el contrario, si un estudio estaba incluido en más de un manuscrito, solamente se tuvo en cuenta los resultados presentados en el manuscrito que indicaba un tamaño muestral más alto. Se utilizaron métodos de gráficos de embudo para evaluar la posible existencia de un sesgo de publicación. Se previeron análisis de metarregresión para explicar las posibles causas de heterogeneidad, incluida la del tamaño muestral de los estudios, la proporción de varones respecto a mujeres, la media de edad y la media de GIM de la población.

## RESULTADOS

De los 4.782 individuos inicialmente incluidos en las dos encuestas, se consideró que 4.014 eran elegibles para el seguimiento, 3.067 (76,4%) acudieron al segundo examen y de 2.667 (66,4%) se dispuso de muestras de ADN (figura). En la tabla 1 se muestra la frecuencia de los alelos, la frecuencia del genotipo, la falta de genotipo disponible y el valor de p para el equilibrio de Hardy-Weinberg. La frecuencia alélica observada concordaba con lo anteriormente descrito en HapMap para la población caucásica, y las frecuencias genotípicas concordaban con el equilibrio de Hardy-Weinberg. La falta de genotipo disponible fue  $< 5\%$  con todos los SNP considerados en estos análisis.

**Tabla 3**

Determinaciones de los parámetros carotídeos estudiados y proporción de individuos con índice tobillo-braza patológico en el conjunto de la muestra y con estratificación por sexo

	Total	Varones	Mujeres
<b>Padientes (n)</b>	2.547	1.195	1.352
GIMacc medio (mm)	0,68 ± 0,16	0,70 ± 0,17	0,66 ± 0,15
GIMacc máximo (mm)	0,87 ± 0,26	0,91 ± 0,26	0,83 ± 0,21
GIMbul medio (mm)	0,76 ± 0,24	0,78 ± 0,26	0,73 ± 0,23
GIMbul máximo (mm)	1,03 ± 0,42	1,08 ± 0,48	0,99 ± 0,37
GIMaci medio (mm)	0,59 ± 0,17	0,61 ± 0,17	0,57 ± 0,15
GIMaci máximo (mm)	0,77 ± 0,27	0,81 ± 0,29	0,76 ± 0,25
<b>Padientes (n)</b>	2.235	1.020	1.215
Rigidez carotídea ( $\text{cm}^2 \text{dina}^{-1} 10^{-6}$ )	5,89 ± 0,26	5,99 ± 0,235	5,80 ± 0,236
<b>Padientes (n)</b>	2.634	1.240	1.394
ITB $< 0,9$ , n (%)	98 (3,7)	53 (4,3)	45 (3,2)

GIMacc: grosor intímo-medial de la arteria carótida común; GIMaci: grosor intímo-medial de la arteria carótida interna; GIMbul: grosor intímo-medial en el bulbo carotídeo; ITB: índice tobillo-braza.

En la tabla 2 se presentan las principales características sociodemográficas y el perfil de FRCV de los participantes en el estudio. En la tabla 3 se indican las características de las mediciones de la aterosclerosis subclínica observada en la muestra. En general, la carga aterosclerótica era mayor en los varones que en las mujeres.

Teniendo en cuenta el tamaño muestral, se dispuso de una potencia estadística suficiente (80%) para detectar un coeficiente  $\beta > 0,040, 0,030, 0,026, 0,024$  y  $0,024$  mm para el GIM de la carótida común, considerando un nivel de significación nominal ( $\alpha = 0,05$ ), un modelo aditivo genético y una frecuencia alélica de 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 y 0,50 respectivamente. En la tabla 4 se detalla la

**Tabla 4**  
Análisis de los diversos grupos genotípicos con ajuste respecto a la edad y el sexo

		Media		Máximo		Rigidez		ITB patológico	
		GIMacc							
<b>rs17465637</b>									
AA	N = 208	0,664 ± 0,009	N = 208	0,843 ± 0,016	N = 207	5,977 ± 0,150	N = 203	0,67 [0,28-1,62]	
AC	N = 1.019	0,673 ± 0,004	N = 1.019	0,855 ± 0,007	N = 1.032	5,903 ± 0,067	N = 1.049	1,11 [0,72-1,70]	
CC	N = 1.256	0,686 ± 0,004	N = 1.256	0,881 ± 0,006	N = 1.276	6,041 ± 0,061	N = 1.299	1	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,018	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,009	R <sup>2</sup> = 0,27	p = 0,311	AUC = 0,74	p = 0,527
<b>rs6725887</b>									
CC	N = 45	0,671 ± 0,020	N = 45	0,834 ± 0,034	N = 44	6,164 ± 0,318	N = 43	1,28 [0,30-5,52]	
CT	N = 609	0,686 ± 0,005	N = 609	0,877 ± 0,009	N = 620	5,944 ± 0,085	N = 635	0,79 [0,47-1,32]	
TT	N = 1.786	0,675 ± 0,003	N = 1.786	0,862 ± 0,005	N = 1.805	5,967 ± 0,050	N = 1.775	1	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,200	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,248	R <sup>2</sup> = 0,28	p = 0,798	AUC = 0,73	p = 0,617
<b>rs9818870</b>									
CC	N = 1.843	0,680 ± 0,003	N = 1.843	0,867 ± 0,005	N = 1.864	5,977 ± 0,050	N = 1.899	1	
CT	N = 582	0,674 ± 0,005	N = 582	0,864 ± 0,009	N = 591	6,005 ± 0,088	N = 605	1,06 [0,64-1,74]	
TT	N = 35	0,648 ± 0,022	N = 35	0,820 ± 0,038	N = 35	5,813 ± 0,362	N = 36	2,45 [0,70-8,55]	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,252	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,460	R <sup>2</sup> = 0,27	p = 0,864	AUC = 0,73	p = 0,414
<b>rs12526453</b>									
CC	N = 1.013	0,675 ± 0,004	N = 1.013	0,864 ± 0,007	N = 1.028	5,958 ± 0,067	N = 1.052	1	
CG	N = 1.136	0,678 ± 0,004	N = 1.136	0,867 ± 0,007	N = 1.141	5,941 ± 0,063	N = 1.163	0,85 [0,55-1,33]	
GG	N = 314	0,681 ± 0,007	N = 314	0,862 ± 0,013	N = 323	6,147 ± 0,119	N = 326	0,55 [0,26-1,20]	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,730	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,926	R <sup>2</sup> = 0,28	p = 0,298	AUC = 0,74	p = 0,228
<b>rs1333049</b>									
CC	N = 654	0,685 ± 0,005	N = 654	0,870 ± 0,009	N = 661	6,005 ± 0,084	N = 674	1	
GC	N = 1.230	0,680 ± 0,004	N = 1.230	0,870 ± 0,007	N = 1.253	5,982 ± 0,061	N = 1.272	0,80 [0,49-1,31]	
GG	N = 599	0,668 ± 0,005	N = 599	0,857 ± 0,009	N = 601	5,947 ± 0,088	N = 615	0,69 [0,38-1,26]	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,065	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,488	R <sup>2</sup> = 0,27	p = 0,890	AUC = 0,74	p = 0,473
<b>rs1746048</b>									
CC	N = 1.864	0,676 ± 0,003	N = 1.864	0,864 ± 0,005	N = 1.883	5,963 ± 0,050	N = 1.919	1	
TC	N = 565	0,687 ± 0,006	N = 565	0,880 ± 0,010	N = 576	6,042 ± 0,090	N = 585	1,30 [0,81-2,09]	
TT	N = 49	0,642 ± 0,019	N = 49	0,802 ± 0,033	N = 50	5,687 ± 0,305	N = 51	0,66 [0,09-4,89]	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,044	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,046	R <sup>2</sup> = 0,27	p = 0,472	AUC = 0,74	p = 0,507
<b>rs9982601</b>									
CC	N = 1.876	0,676 ± 0,003	N = 1.876	0,865 ± 0,005	N = 1.896	6,031 ± 0,049	N = 1.941	1	
CT	N = 551	0,683 ± 0,006	N = 551	0,867 ± 0,010	N = 560	5,812 ± 0,090	N = 565	0,92 [0,55-1,56]	
TT	N = 32	0,682 ± 0,023	N = 32	0,859 ± 0,040	N = 34	5,487 ± 0,367	N = 33	1,89 [0,43-8,40]	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,619	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,970	R <sup>2</sup> = 0,28	p = 0,043	AUC = 0,74	p = 0,729
<b>rs1045872</b>									
AA	N = 2.121	0,679 ± 0,003	N = 2.121	0,867 ± 0,005	N = 2.143	5,964 ± 0,047	N = 2.189	1	
GA	N = 370	0,683 ± 0,007	N = 370	0,870 ± 0,012	N = 381	6,031 ± 0,111	N = 389	1,96 [1,21-3,16]	
GG	N = 13	0,670 ± 0,037	N = 13	0,911 ± 0,064	N = 14	5,660 ± 0,581	N = 14	—	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,799	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,769	R <sup>2</sup> = 0,27	p = 0,741	AUC = 0,75	p = 0,022
<b>ALOX5AP haplotipo B</b>									
0 <sup>*</sup>	N = 1.433	0,679 ± 0,003	N = 1.433	0,870 ± 0,006	N = 1.452	5,990 ± 0,057	N = 1.434	1	
1 <sup>*</sup>	N = 902	0,679 ± 0,004	N = 902	0,865 ± 0,008	N = 916	5,960 ± 0,071	N = 894	0,86 [0,55-1,34]	
2 <sup>*</sup>	N = 159	0,669 ± 0,010	N = 159	0,853 ± 0,018	N = 160	6,010 ± 0,171	N = 157	0,49 [0,15-1,60]	
		R <sup>2</sup> = 0,33	p = 0,629	R <sup>2</sup> = 0,23	p = 0,655	R <sup>2</sup> = 0,27	p = 0,930	AUC = 0,75	p = 0,381

AUC: área bajo la curva; GIMacc: grosor intimo-medial de la arteria carótida común; ITB: índice tobillo-braza.

Se muestra media ± error estándar de la media y los máximos grosor intimo-medial de la arteria carótida común y rigidez carotídea; odds ratio [intervalo de confianza del 95%] de los individuos con índice tobillo-braza patológico. Se muestra la variabilidad (R<sup>2</sup>) o la capacidad de discriminación (área bajo la curva) explicada con cada modelo.

\* Número de variantes haplotípicas de riesgo (AGA).

**Tabla 5**

Coefficientes de regresión con ajuste por edad y sexo para la asociación entre la puntuación de riesgo genético (por cada 1 desviación estándar) y diferentes medidas de la aterosclerosis subclínica

	sGRS	p	R <sup>2</sup> /AUC
GIMbul máximo	0,006 ± 0,009	0,488	0,16
GIMacc máximo	0,001 ± 0,005	0,792	0,23
GIMaci máximo	0,005 ± 0,006	0,423	0,08
GIMbul medio	0,006 ± 0,005	0,191	0,19
GIMacc medio	0,003 ± 0,003	0,370	0,33
GIMaci medio	0,004 ± 0,004	0,253	0,09
Rigidez media	0,000 ± 0,045	0,997	0,27
ITB patológico	-0,030 ± 0,111	0,793	0,74

AUC: área bajo la curva; GIMacc: grosor intímo-medial de la arteria carótida común; GIMaci: grosor intímo-medial de la arteria carótida interna; GIMbul: grosor intímo-medial en el bulbo carotídeo; ITB: índice tobillo-brazo; sGRS: puntuación de riesgo genético estandarizada.

Coefficientes lineales de las mediciones carotídeas ± error estándar, valor de p y variabilidad explicada por el modelo (R<sup>2</sup>) y coeficiente logístico (error estándar; valor de p y área bajo la curva receiver operating characteristic del modelo) para el índice tobillo-brazo patológico.

asociación entre los diferentes SNP y las mediciones de la aterosclerosis subclínica (GIMacc medio, GIMacc máximo, rigidez carotídea e ITB patológico). La asociación con las demás mediciones de la aterosclerosis subclínica (GIMbul medio, GIMbul máximo, GIMaci medio y GIMaci máximo) se muestran en la tabla 1 del material suplementario. Tan solo el rs10455872 (genotipo GA frente a AA) tendió a asociarse a mayor probabilidad de ITB patológico (odds ratio = 1,96; intervalo de confianza del 95%, 1,21-3,17; p = 0,022). No se observó ninguna otra asociación uniforme entre un SNP y alguna medición de la aterosclerosis. La puntuación de riesgo genético ponderada no estaba asociada con los diferentes indicadores de aterosclerosis evaluados en este estudio (tabla 5).

### Revisión sistemática y metanálisis

El método de evaluación de la rigidez carotídea o arterial fue muy heterogéneo entre los distintos estudios, y el número de estudios que evaluaron este fenotipo es escaso; en consecuencia, en el metanálisis no se tuvo en cuenta este marcador de la aterosclerosis. Murabito et al. han publicado recientemente un metanálisis de estudios del ITB que incluye a más de 60.000 participantes<sup>27</sup>. Por consiguiente, se limitó el metanálisis al GIMacc.

**Tabla 6**

Resultados del metanálisis de la asociación entre las variantes genéticas de interés y el grosor intímo-medial de la arteria carótida común

	Referencias	Estudios <sup>a</sup> , n	Individuos, n	Coeficiente de regresión lineal	IC95%	p, asociación <sup>b</sup>	Heterogeneidad	
							I <sup>2</sup>	p
rs17465637	34, 36	4	6.676	0,004	-0,002 a 0,009	0,209	4,24	0,237
rs6725887	34, 36	5	7.801	-0,013	-0,024 a -0,003	0,014	13,27	0,010
rs9818870	34, 36	4	7.066	0,002	-0,004 a 0,007	0,602	2,98	0,395
rs12526453	34, 36	5	7.821	-0,002	-0,008 a 0,004	0,497	7,88	0,096
rs1746048 <sup>c</sup>	33, 34, 36	8	10.581	0,008	0,001-0,015	0,031	11,2	0,130
rs9982601	34, 36	5	7.817	-0,002	-0,007 a 0,003	0,479	3,65	0,455
rs1333049 <sup>d</sup>	28-32, 34, 36	10	32.056	-0,001	-0,003 a 0,002	0,684	16,68	0,162
rs10455872	32	3	6.676	-0,003	-0,006 a 0,001	0,179	0,53	0,768

IC95%: intervalo de confianza del 95%.

<sup>a</sup> Un original podía incluir más de un estudio.

<sup>b</sup> Valor de p para el modelo de efectos aleatorios.

<sup>c</sup> Algunos estudios analizaron el polimorfismo de un solo nucleótido rs501120 en desequilibrio de ligamiento con el rs1746048.

<sup>d</sup> Algunos estudios analizaron el polimorfismo de un solo nucleótido rs4977574 en desequilibrio de ligamiento con el rs1333049.

El proceso utilizado para la selección de los estudios incluidos en el metanálisis se resume en la tabla 2 del material suplementario. Finalmente se incluyeron nueve artículos<sup>28-36</sup>, y el número de participantes incluidos en el metanálisis fue de entre 6.676 (rs17465637 y rs10455872) y 32.056 (rs1333049). Los resultados presentados en los estudios incluidos en el metanálisis se muestran en la tabla 3 del material suplementario. Los resultados del metanálisis indican asociación negativa entre el alelo de riesgo rs6725887 (C) y el GIM carotídeo y asociación positiva entre el alelo de riesgo rs1746048 (C) y el GIM carotídeo (tabla 6). Había heterogeneidad entre los estudios que evaluaron la asociación entre rs6725887 y el GIM carotídeo (p = 0,010) (tabla 6). En el análisis de meta-regresión se identificó que el GIM medio de la población explicaba esa heterogeneidad: había asociación en las poblaciones con GIM medio más alto, pero no se observaba en cambio en las que tenían un GIM más bajo (figura del material suplementario). No se observaron asociaciones entre las demás variantes genéticas seleccionadas y el GIMacc (tabla 6). Se dispuso de una potencia estadística del 80% para la detección de un coeficiente β situado entre > 0,007 mm para rs1333049 y > 0,027 mm para rs10455872. Los gráficos de embudo no indican que haya sesgo de publicación.

### DISCUSIÓN

En este estudio se presenta la ausencia de asociación entre nueve variantes genéticas asociadas a la EC pero no a los FRCVc y tres mediciones de la aterosclerosis subclínica (GIM carotídeo, rigidez carotídea e ITB) en una encuesta de base poblacional. Este resultado se observa tanto con las variantes analizadas individualmente como considerando la puntuación de riesgo genético ponderada. Además, se ha resumido toda la información disponible en diferentes metanálisis y se ha observado que solo el alelo de riesgo rs1746048 (CXCL12) tiene asociación directa con el GIM carotídeo, mientras que el alelo de riesgo rs6725887 (WDR12) muestra asociación inversa con el GIM carotídeo (contrariamente a lo esperado).

Estos resultados amplían lo observado en tres estudios recientes con objetivos similares. Conde et al<sup>35</sup> utilizaron datos de tres estudios europeos de base poblacional para evaluar la asociación entre 12 variantes genéticas (siete de ellas incluidas en el presente estudio, que añadían el SNP LPA y el ALGX5AP HapB) y el GIM medio de la arteria carótida común; ninguna de las variantes individuales se asoció al parámetro de interés. Hernessniemi et al<sup>36</sup> analizaron la asociación entre una puntuación de riesgo genético



basada en 24 SNP identificados en un estudio de genoma completo como asociados a la EC (siete de ellos incluidos en nuestro estudio) y el GIM carotídeo y la elasticidad carotídea en dos poblaciones finlandesas y una estadounidense. Estos autores no observaron asociación alguna con el GIM carotídeo determinado en dos momentos diferentes (2001 y 2007) ni con la progresión del grosor en ese periodo de 6 años. También analizaron la asociación de los diversos SNP con las mediciones de la aterosclerosis subclínica; aunque dos de los SNP tendían a presentar asociación con el GIM carotídeo (rs4977574) o la elasticidad carotídea (rs4773144), no se pudo reproducir estos resultados<sup>36</sup>. Por último, Zhang et al<sup>28</sup> seleccionaron 10 SNP asociados con la EC (solo rs1333049 en común con el presente estudio) y analizaron su asociación con cuatro mediciones de la aterosclerosis subclínica (GIMacc y GIMad, presencia de placa carotídea e ITB patológico) en cinco encuestas de base poblacional. Estos autores observaron que rs780094 (*GCKR*) se asocia a placa carotídea en la población amerindia estadounidense, pero no en los estadounidenses de origen europeo, afroamericano o mexicano. No se registró ninguna otra asociación entre los demás SNP y los demás fenotipos intermedios de interés<sup>28</sup>.

Los resultados del metanálisis respaldan la ausencia de asociación entre la mayor parte de estas variantes genéticas y la aterosclerosis subclínica. Estos resultados tienen varias explicaciones posibles.

En primer lugar, los mecanismos que explican la asociación entre estas nueve variantes genéticas y la EC no están relacionados con el remodelado arterial, la esclerosis o una limitación del flujo distal, y probablemente no se manifiestan en la pared arterial y no se ven reflejadas en cambios del GIM carotídeo, la rigidez o el ITB. Otros marcadores de la aterosclerosis subclínica, como la presencia de placa, podrían ser más sensibles para detectar esta progresión; algunos estudios han puesto de manifiesto el importante papel predictivo de la presencia y el grado de placas ateroscleróticas determinados mediante tomografía computarizada como posible sustrato para los eventos coronarios<sup>37</sup>. Una explicación más específica puede estar relacionada con la estabilidad de la placa; algunas variantes genéticas podrían predisponer al desarrollo de placas de aterosclerosis estables, mientras que otras podrían predisponer a la inestabilidad de la placa, con el consiguiente aumento del ulterior riesgo de rotura, trombosis e infarto agudo de miocardio. Un reciente estudio ha demostrado que hay variantes genéticas específicas y diferentes que fomentan el desarrollo de la aterosclerosis coronaria (en el gen *ADAMTS7*), mientras que otras se asocian a eventos agudos, como el infarto de miocardio (en el gen *ABO*)<sup>38</sup>. A favor de este argumento, se observa que solo el alelo de riesgo rs1746048 del gen *CXCL12* se asocia al GIM carotídeo en el sentido esperado. La proteína *CXCL12* se ha asociado a estabilización de la placa<sup>39</sup> y podría facilitar el remodelado arterial que puede detectarse por un engrosamiento de la pared de la arteria. En cambio, el alelo de riesgo rs6725887 del gen *WDR12* se asocia a mayor riesgo de EC pero con menor GIM carotídeo. El gen *WDR12* codifica una proteína que interviene en diversos procesos celulares como la progresión del ciclo celular y la proliferación celular. Este alelo de riesgo podría inhibir la proliferación de las células de músculo liso, comprometer la estabilidad de la placa y aumentar el riesgo de eventos agudos sin inducir un engrosamiento de la arteria.

Otra posible explicación podría estar relacionada con mecanismos diferentes y progresión de la aterosclerosis en distintos territorios arteriales. Bis et al<sup>40</sup> identificaron tres variantes genéticas asociadas al GIM carotídeo y dos asociadas a la placa carotídea en un metanálisis de nueve poblaciones participantes en el consorcio CHARGE. La única variante asociada a la aterosclerosis carotídea en ese metanálisis y también a la EC en el consorcio CARDIOGRAM fue la de rs1878406 (*EDNRA*). Por otro lado, tan solo hay un estudio de genoma completo que haya tenido como

objetivo identificar variantes genéticas asociadas al ITB, que incluyó 21 estudios de base poblacional<sup>27</sup>. Solo se identificó una asociación de genoma completo significativa con el ITB, en el cromosoma 9p21 (rs10757269 en LD con rs1333049;  $R^2 = 0,87$ ). Aunque este locus se asocia también a la EC, las demás variantes asociadas a la EC no se asociaban al ITB.

Este estudio tiene algunas posibles limitaciones. En primer lugar, el tamaño muestral es pequeño y no se puede descartar que la magnitud de la asociación sea demasiado baja para detectarla con esta potencia estadística; no obstante, el metanálisis de toda la información disponible se diseñó para aumentar la potencia estadística del estudio. En segundo lugar, solo se pudo incluir en el estudio a los participantes que acudieron a la visita de seguimiento, y no se puede descartar la posibilidad de un sesgo de selección que pudiera afectar a los resultados, probablemente favorable a la hipótesis nula. En tercer lugar, no se incluyeron las variantes genéticas asociadas a la EC de manera independiente de los FRVC que se han identificado más recientemente en el consorcio CARDIOGRAM-C4D. Entre los puntos fuertes del estudio, está el hecho de que se incluyeran varias mediciones subclínicas obtenidas con métodos estandarizados en la población de estudio y que se analizara el efecto individual y conjunto de las variantes genéticas seleccionadas.

## CONCLUSIONES

Los resultados indican que las variantes genéticas analizadas que se asocian a la EC de manera independiente de los FRVC influyen en el riesgo de EC por mecanismos independientes de la aterosclerosis subclínica medida con el GIM carotídeo, la rigidez carotídea o el ITB, con la excepción de rs1746048 (*CXCL12*) y rs6725887 (*WDR12*). Estos resultados generan hipótesis respecto a que la variante *CXCL12* parece influir en el riesgo de EC a través del remodelado y el engrosamiento de las arterias, mientras que la variante de riesgo *WDR12* podría estar relacionada con una mayor vulnerabilidad de la placa. Serán necesarios estudios funcionales para confirmar tales hipótesis.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Susanna Tello, Marta Cabañero y Leny Franco la gestión de proyecto y de los datos. Agradecemos también la corrección del texto inglés por parte de Elaine Lilly de *Writer's First Aid*.

## FINANCIACIÓN

Esta investigación tuvo el respaldo de la financiación del Gobierno de España a través del Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Desarrollo Regional Europeo (Red HERACLES RD12/0042); Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI11/01801; PS09/00456); CIBERESP; Fundació La Marató de TV3 (081632), y Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2009 SGR 1195).

## CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



Se puede consultar material suplementario a este artículo en su versión electrónica disponible en doi:10.1016/j.recesp.2014.10.023.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095-128. Erratum in: *Lancet*. 2013;381:628.
- Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2197-223. Fe de errores en: *Lancet*. 2013;381:628.
- McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316:1488-91.
- Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007;316:1491-3.
- Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genome-wide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2007;357:443-53.
- Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, et al. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet*. 2009;41:280-2.
- Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet*. 2009;41:334-41.
- Tregouet DA, König IR, Erdmann J, Munteanu A, Braund PS, Hall AS, et al. Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2009;41:283-5.
- Coronary Artery Disease (CAD) Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011;43:339-44.
- Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, et al. CARDIoGRAM Consortium. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011;43:333-8.
- CARDIoGRAMplus4C Consortium. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2013;45:25-33.
- Juonala M, Viikari JS, Kahönen M, Taittonen L, Laitinen T, Hutri-Kähönen N, et al. Lifetime risk factors and progression of carotid atherosclerosis in young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns study. *Eur Heart J*. 2010;31:1745-51.
- O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson Jr SK, et al. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *N Engl J Med*. 1999;340:14-22.
- Dijk JM, Algra A, Van der Graaf Y, Grobbee DE; SMART study group. Carotid stiffness and the risk of new vascular events in patients with manifest cardiovascular disease. The SMART study. *Eur Heart J*. 2005;26:1213-20.
- Ankle Brachial Index Collaboration. Ankle brachial index combined with Framingham risk score to predict cardiovascular events and mortality. *JAMA*. 2008;300:197-208.
- Lluis-Ganella C, Subirana I, Lucas G, Tomás M, Muñoz D, Senti M, et al. Assessment of the value of a genetic risk score in improving the estimation of coronary risk. *Atherosclerosis*. 2012;222:456-63.
- Bardaji A. REGICOR: 35 años de excelencia en investigación cardiovascular. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:923-5.
- Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, Kyriakou T, Goel A, Heath SC, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N Engl J Med*. 2009;361:2518-28.
- Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdottir S, Jonasdottir H, Thorsteinsdottir U, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*. 2004;36:233-9.
- De Groot E, Van Leuven SI, Duivenvoorden R, Meuwese MC, Akdim F, Bots ML, et al. Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5:280-8.
- Van Bortel LM, Duprez D, Starmans-Kool MJ, Safar ME, Giannattasio C, Cockcroft J, et al. Clinical applications of arterial stiffness. Task Force III: Recommendations for user procedures. *Am J Hypertens*. 2002;15:445-52.
- Sinwell JP, Schaid DJ. haplo.stats: Statistical Analysis of Haplotypes with Traits and Covariates when Linkage Phase is Ambiguous. R package version 1.6.3; 2013 [citado 28 Oct 2014]. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013 [citado 28 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.R-project.org/>
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med*. 2009;6:e1000097.
- Lumley T. rmeta: Meta-analysis. R package version 2.16. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2012 [citado 28 Oct 2014]. Disponible en: <http://CRAN.R-project.org/package=rmeta>
- DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clinical Trials*. 1986;7:177-88.
- Murabito JM, White CC, Kavousi M, Sun YV, Feitosa MF, Nambi V, et al. Association between chromosome 9p21 variants and the ankle-brachial index identified by a metaanalysis of 21 genome-wide association studies. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:100-12.
- Zhang L, Buzkova P, Wassel CL, Roman MJ, North KE, Crawford DC, et al. Lack of associations of ten candidate coronary heart disease risk genetic variants and subclinical atherosclerosis in four U.S. populations: The Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) study. *Atherosclerosis*. 2013;228:390-9.
- Pichart M, Empiana JP, Lambert JC, Amouyel P, Tiret L, Leterneur L, et al. Single polymorphism nucleotide rs1333049 on chromosome 9p21 is associated with carotid plaques but not with common carotid intima-media thickness in older adults. A combined analysis of the Three-City and the EVA studies. *Atherosclerosis*. 2012;222:187-90.
- Lin HF, Tsai PC, Lin RT, Khor GT, Sheu SH, Juo SH. Sex differential genetic effect of chromosome 9p21 on subclinical atherosclerosis. *PLoS One*. 2010;5:e15124.
- Ye S, Willeit J, Kronenberg F, Xu Q, Kiechl S. Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis: a population-based, prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:378-84.
- Samani NJ, Taitakari OT, Sipilä K, Tobin MD, Schunkert H, Juonala M, et al. Coronary artery disease-associated locus on chromosome 9p21 and early markers of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1679-83.
- Kiechl S, Laxton RC, Xiao Q, Hernessniemi JA, Raitakari OT, Kähönen M, et al. Coronary artery disease-related genetic variant on chromosome 10q11 is associated with carotid intima-media thickness and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:2678-83.
- Helgadottir A, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Holm H, Patel RS, Gudnason T, et al. Apolipoprotein(a) genetic sequence variants associated with systemic atherosclerosis and coronary atherosclerotic burden but not with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:722-9.
- Conde L, Bevan S, Sitzer M, Klopp N, Illig T, Thiery J, et al. Novel associations for coronary artery disease derived from genome wide association studies are not associated with increased carotid intima-media thickness, suggesting they do not act via early atherosclerosis or vessel remodelling. *Atherosclerosis*. 2011;219:684-9.
- Hernessniemi JA, Seppälä I, Lyytikäinen LP, Mononen N, Oksala N, Hutri-Kähönen N, et al. Genetic profiling using genome-wide significant coronary artery disease risk variants does not improve the prediction of subclinical atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Bogalusa Heart Study and the Health 2000 Survey-A meta-analysis of three independent studies. *PLoS One*. 2012;7:e28931.
- Descalzo M, Leta R, Rosselló X, Alomar X, Carreras F, Pons-Lladó G. Enfermedad coronaria subclínica por tomografía computarizada multidetector en población asintomática estratificada por nivel de riesgo coronario. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:504-5.
- Reilly MP, Li M, He J, Ferguson JF, Stylianou IM, Mehta NN, et al. Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. *Lancet*. 2011;377:383-92.
- Akhtar S, Gremse F, Kiessling F, Weber C, Schober A. CXCL12 promotes the stabilization of atherosclerotic lesions mediated by smooth muscle progenitor cells in Apoe-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:679-86. Fe de errores en: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:e125.
- Bis JC, Kavousi M, Franceschini N, Isaacs A, Abecasis GR, Schminke U, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE consortium identifies common variants associated with carotid intima media thickness and plaque. *Nat Genet*. 2011;43:940-7.

## 4.2 ARTÍCULO 2

Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, Masiá R, Marrugat J, Brugada R, Elosua R. *Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel*. Heart. 2012;98:100-8

*Heart* tiene un factor de impacto de 6,023 y está clasificada en la posición 12ª (primer cuartil y primer decil) entre las 125 revistas de investigación biomédica incluidas en la categoría de Cardiología (©2014 Journal Citation Reports, publicado por Thomson Reuters).

## Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel

Michel Zabalza,<sup>1</sup> Isaac Subirana,<sup>2,3</sup> Joan Sala,<sup>1,4</sup> Carla Lluís-Ganella,<sup>3</sup> Gavin Lucas,<sup>3</sup> Marta Tomás,<sup>3</sup> Rafel Masiá,<sup>1</sup> Jaume Marrugat,<sup>3</sup> Ramon Brugada,<sup>1,4,5</sup> Roberto Elosua<sup>2,3</sup>

► Additional materials are published online only. To view these files please visit the journal online (<http://heart.bmj.com/content/98/2.toc>).

<sup>1</sup>Cardiology Department, Hospital Universitari Josep Trueta, Girona, Spain

<sup>2</sup>CIBER Epidemiology and Public Health, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Cardiovascular Epidemiology and Genetics, IMIM (Institut de Recerca Hospital del Mar), Barcelona, Spain

<sup>4</sup>School of Medicine, Girona University, Girona, Spain

<sup>5</sup>Cardiovascular Genetics Center, Girona, Spain

### Correspondence to

Roberto Elosua, Cardiovascular Epidemiology and Genetics, IMIM, Dr Aiguader 88, Barcelona 08003, Catalonia, Spain; [relousa@imim.es](mailto:relousa@imim.es)

### ABSTRACT

**Aims** To perform a meta-analysis of the association between *CYP2C19* loss- and gain-of-function variants and cardiovascular outcomes and bleeding in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel, and to explore the causes of heterogeneity between studies.

**Methods** A comprehensive literature search was conducted. A random-effects model was used to summarise the results. In the presence of between-study heterogeneity, a meta-regression analysis was performed to identify study characteristics explaining this heterogeneity.

**Results** Patients who carried a loss-of-function allele, mainly *CYP2C19\*2*, did not present an increased risk of a cardiovascular event, HR = 1.23 (95% CI 0.97 to 1.55). Substantial heterogeneity was observed between studies ( $I^2 = 35.6$ ), which was partially explained by the study sample size: the pooled HR was higher among studies with a sample size <500 patients (HR = 3.55; 95% CI 1.66 to 7.56) and lower among studies with a sample size  $\geq 500$  (HR = 1.06; 95% CI 0.89 to 1.26). *CYP2C19\*2* was associated with an increased risk of a stent thrombosis (HR = 2.24; 95% CI 1.52 to 3.30). The gain-of-function allele, mainly *CYP2C19\*17*, was associated with a lower risk of cardiovascular events (HR = 0.75; 95% CI 0.66 to 0.87) and a higher risk of major bleeding (HR = 1.26; 95% CI 1.05 to 1.50).

**Conclusions** Not only *CYP2C19* loss-of-function but also gain-of-function alleles should be considered to define the pharmacogenetic response to clopidogrel. The results question the relevance of the *CYP2C19* loss-of-function alleles in the prediction of major cardiovascular events beyond stent thrombosis in coronary patients treated with clopidogrel. The gain-of-function variant is associated with a lower risk of cardiovascular events but a higher risk of bleeding.

### INTRODUCTION

Dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel is the standard of care following acute coronary syndrome and percutaneous coronary intervention (PCI) to prevent recurrent ischaemic events and to improve other clinical outcomes.<sup>1–3</sup> However, even with the use of such therapy, a substantial number of subsequent ischaemic events still occur in these groups of patients.<sup>1</sup> A

possible explanation is the documented interindividual variability in response to clopidogrel,<sup>4</sup> which results in increased risk of ischaemic events among those patients with attenuated response to this drug.<sup>5</sup>

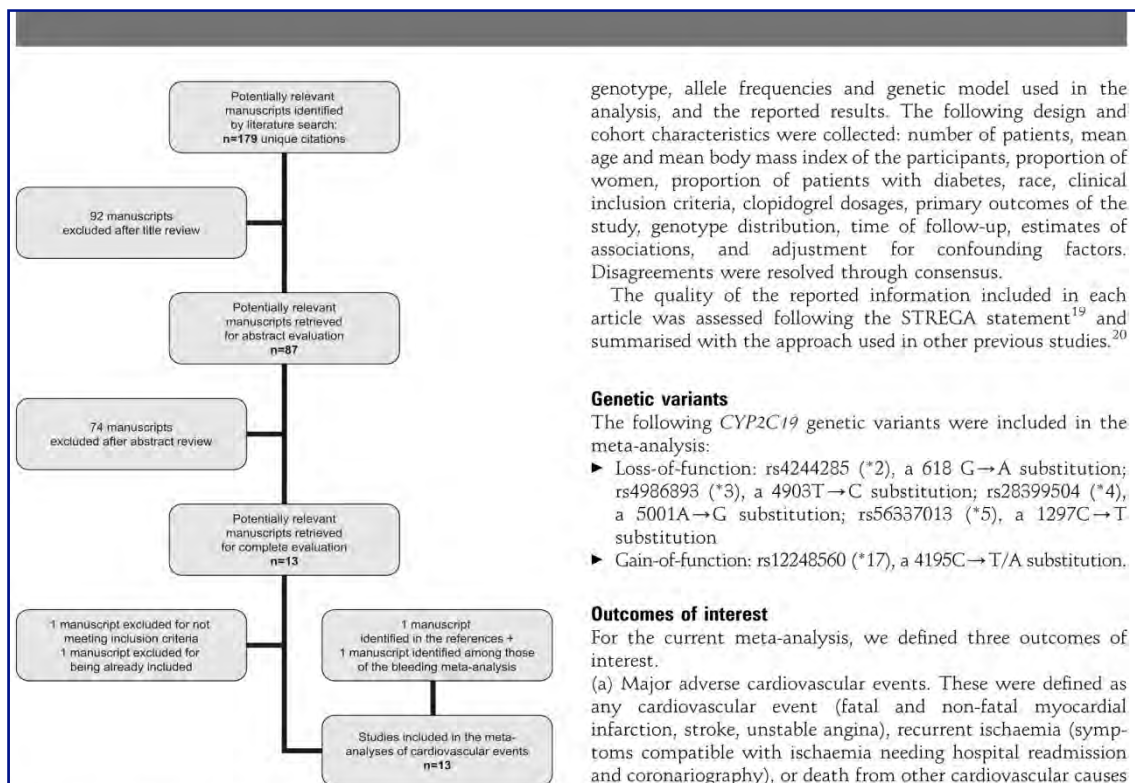
The mechanisms leading to a poor response to clopidogrel are not clearly understood, although it has been suggested that clinical, cellular or genetic factors may be involved.<sup>6</sup> The prodrug, clopidogrel, is converted into an active metabolite, which selectively and irreversibly binds to the P2Y<sub>12</sub> receptor on the platelet membrane.<sup>7–9</sup> Conversion is achieved by the hepatic cytochrome P450 (CYP) system in a two-step oxidative process, and CYP2C19 is involved in both of these steps. In recent years, several studies have reported a series of loss-of-function alleles in *CYP2C19*, in particular the *CYP2C19\*2* allele, that result in reduced activation of clopidogrel,<sup>10–11</sup> a lower antiplatelet effect,<sup>12–14</sup> and increased risk of cardiovascular events in patients receiving clopidogrel. Recently, four meta-analyses<sup>15–18</sup> have reported a significant association between the *CYP2C19\*2* allele and adverse major cardiovascular clinical outcomes and stent thrombosis in patients with coronary artery disease (CAD) treated with clopidogrel. However, most of these meta-analyses report significant heterogeneity between studies, although the causes of this heterogeneity have not yet been established. Moreover, none of these meta-analyses has explored the role of *CYP2C19* gain-of-function variants in major cardiovascular clinical outcomes and the risk of bleeding.

The aims of this study were to: (i) perform an updated systematic review and a meta-analysis of previous studies that analysed the association between *CYP2C19* loss- and gain-of-function variants and cardiovascular outcomes and major bleeding in patients with CAD treated with clopidogrel; (ii) explore the potential causes of heterogeneity between studies.

### MATERIALS AND METHODS

#### Study selection

A comprehensive search of the PubMed and ISI Web of Science databases from its inception through October 2010 was conducted to identify studies that evaluated the relationship between



**Figure 1** Flow diagram of the systematic review process.

genetic variants in *CYP2C19* and cardiovascular events and bleeding. For cardiovascular events, we queried MeSH terms and the article text for the following search terms: ('clopidogrel') AND ('angioplasty', 'revascularisation', 'outcome', 'cardiovascular events', 'stent thrombosis', 'recurrence', 'acute coronary syndrome', 'percutaneous intervention') AND ('genetics', 'genotype', 'gene', 'snp', 'polymorphism'). For bleeding events, we substituted the list of clinical events for 'bleeding' and we kept the rest of the terms previously mentioned.

The articles returned by this search were manually screened, first on the basis of the title, then the abstract and finally the complete manuscript, to assess their appropriateness for inclusion in the meta-analysis. References cited in these articles were also reviewed to identify additional published articles not identified by the database search.

Case reports, abstracts, editorials and review articles were excluded. The search strategy was limited to articles published in English.

The meta-analysis included genetic association studies that fulfilled the following criteria: (i) the study analysed genotype data for the *CYP2C19* loss- or gain-of-function polymorphisms; (ii) study participants were patients with CAD receiving clopidogrel treatment; (iii) the study used a case-control or prospective design; (iv) the study evaluated clinical outcomes; and (v) the study reported data on the size and variance of the risk effect.

#### Data extraction

Two investigators (MZ and RE) independently extracted data. The data extracted included information about the study design characteristics, the outcomes assessed, the cohort characteristics,

genotype, allele frequencies and genetic model used in the analysis, and the reported results. The following design and cohort characteristics were collected: number of patients, mean age and mean body mass index of the participants, proportion of women, proportion of patients with diabetes, race, clinical inclusion criteria, clopidogrel dosages, primary outcomes of the study, genotype distribution, time of follow-up, estimates of associations, and adjustment for confounding factors. Disagreements were resolved through consensus.

The quality of the reported information included in each article was assessed following the STREGA statement<sup>19</sup> and summarised with the approach used in other previous studies.<sup>20</sup>

#### Genetic variants

The following *CYP2C19* genetic variants were included in the meta-analysis:

- ▶ Loss-of-function: rs4244285 (\*2), a 618 G→A substitution; rs4986893 (\*3), a 4903T→C substitution; rs28399504 (\*4), a 5001A→G substitution; rs56337013 (\*5), a 1297C→T substitution
- ▶ Gain-of-function: rs12248560 (\*17), a 4195C→T/A substitution.

#### Outcomes of interest

For the current meta-analysis, we defined three outcomes of interest.

(a) Major adverse cardiovascular events. These were defined as any cardiovascular event (fatal and non-fatal myocardial infarction, stroke, unstable angina), recurrent ischaemia (symptoms compatible with ischaemia needing hospital readmission and coronariography), or death from other cardiovascular causes during follow-up.

(b) Definite or probable stent thrombosis. Definite stent thrombosis was defined as acute coronary syndrome and either angiographic or pathological confirmation of thrombosis. Probable stent thrombosis was defined as unexplained death or myocardial infarction in the territory supplied by a stented vessel without angiographic confirmation.

(c) Major bleeding. Defined in most of the studies according to the TIMI criteria (intracranial haemorrhage or clinically significant overt signs of haemorrhage associated with a fall in haemoglobin of >5 g/dl (or, when haemoglobin is not available, an absolute fall in packed cell volume of >15%)).

#### Statistical analysis

Owing to the low frequency of the minor alleles analysed in this study at the population level, most of the studies have defined a genetic dominant model. We also defined a genetic dominant model for this meta-analysis, in which the carriers of the rare allele were compared with those homozygous for the wild-type allele.

Statistical analysis for the meta-analyses was performed using the *meta*. *DSL* function from the R package *rmeta*. We calculated the overall HR, 95% CI and two-sided p value under a random-effects model (RE; DerSimonian and Laird).<sup>21</sup> We tested for heterogeneity of effects between studies by computing the  $I^2$  statistic. In the presence of between-study heterogeneity, a meta-regression analysis was performed under a mixed-effects model<sup>22</sup> to establish whether any of the following study characteristics could account for this heterogeneity: study design (observational or clinical trial), clinical outcomes included in the study (acute coronary syndrome or PCI), sample size (<500 patients or ≥500 patients), duration of follow-up (<1 year or ≥1 year), type of patients according to risk (low- and high-risk according to the incidence of cardiovascular outcomes <7% or

**Table 1** Characteristics of studies included in the meta-analyses

Author	Year	Country	Sample size	Mean age (years)	Male (%)	Ethnicity	Disease	Genetic variant	Outcome	Stent thrombosis (n=)	Follow-up	Covariate adjustment	STREGA n/N %
Trank <i>et al</i> <sup>23</sup>	2008	Germany	797	66	78	—	Elective PCI	CYP2C19*2	MACE: death, MI (n=24)	—	1 year	Baseline and procedural variables.	26/36 72.2
Malek <i>et al</i> <sup>25</sup>	2008	Poland	105	60	70	—	ACS + PCI	CYP2C19*2	MACE: death, MI (n=6)	—	1 year	None	19/38 50.0
Shuldiner <i>et al</i> <sup>24</sup>	2009	USA	95	64	60	62% Caucasian; 37% African-American	Elective PCI	CYP2C19*2	MACE: MI, revascularisation, death, stroke, hospitalisation for ischaemia (n=20)	Stent thrombosis (n=24)	1 year	Age, gender, race	29/35 82.9
Giusti <i>et al</i> <sup>25</sup>	2009	Italy	772	—	75	—	Elective PCI: 34%, ACS+PCI: 66%	CYP2C19*2	Stent thrombosis, death (n=29)	Stent thrombosis (n=24)	6 months	Residual platelet reactivity, CV risk factors, procedural variables	25/37 67.6
Sibbing <i>et al</i> <sup>26</sup>	2009	Germany	2485	67	78	—	Elective PCI	CYP2C19*2	MACE: MI, stroke, death (n=173)	Stent thrombosis (n=17)	30 days	Age, diabetes, type of stent, ACS, use of abciximab	29/33 87.9
Collet <i>et al</i> <sup>27</sup>	2009	France	259	40	92	Most white	Acute MI	CYP2C19*2	MACE: MI, revascularisation, cardiovascular death (n=26)	Stent thrombosis (n=12)	>4 years	BMI, smoking, diabetes, stent implantation, STEMI, use of proton-pump inhibitors	31/36 86.1
Mega <i>et al</i> <sup>1, 28</sup>	2009, 2010	USA	1477	60	71	98% Caucasian	ACS+PCI	CYP2C19 loss-of-function (*2,5)	MACE: MI, stroke, cardiovascular death (n=129)	Stent thrombosis (n=20)	15 months	—	33/40 82.5
Simon <i>et al</i> <sup>29</sup>	2009	France	2208	68	72	—	Acute MI	CYP2C19 loss-of-function (*2,5); CYP2C19 gain-of-function (*17)	MACE: MI, stroke, death (n=294)	—	1 year	Full propensity score	32/40 80.0
Paré <i>et al</i> <sup>30</sup>	2010	Canada	2549	64	59	86% Caucasian; 14% Hispanic	ACS	CYP2C19 loss-of-function (*2,3); CYP2C19 gain-of-function (*17)	MACE: MI, stroke, cardiovascular death (n=230)	Major bleeding (n=135/3119)	1 year	Age, sex, ancestry, use of stent, smoking, waist, diabetes, hypertension, country of origin	30/40 75.0
Wallentin <i>et al</i> <sup>31</sup>	2010	Sweden	4904	63	69	98% Caucasian	ACS	CYP2C19 loss-of-function (*2,5); CYP2C19 gain-of-function (*17)	MACE: MI, stroke, cardiovascular death (n=481)	Stent thrombosis (n=56/3284)	1 year	Ethnic, sex, use of PPI, aspirin dose, smoking, diabetes	32/38 84.2
Tiroch <i>et al</i> <sup>32</sup>	2010	Germany	928	65	75	—	MI + PCI (90%)	CYP2C19*2; gain-of-function CYP2C19*17	MACE: MI, revascularisation, death (n=239)	—	1 year	Age, gender, diabetes, extent of coronary artery disease	26/37 70.3

Continued

Table 1 Continued

Author	Year	Country	Sample size	Mean age (years)	Male (%)	Ethnicity	Disease	Genetic variant	Outcome	Stent thrombosis (n=176 cases and 420 controls)	Major bleeding (n=12)	Follow-up	Covariate adjustment	STREGA n/N	%
Harmsze et al. <sup>33</sup>	2010	Netherlands	596	63	78	—	PCI	CYP2C19 loss-of-function (*2,*3)	MACE: MI, revascularisation, death (n=56)	Stent thrombosis (n=176 cases and 420 controls)	Major bleeding (n=12)	1 year	Age, gender, BMI, smoking, diabetes, prior MI, use of PPIs, ACS as indication of PCI, procedural variables	26/39	66.7
Sibbing et al. <sup>36</sup>	2010	Germany	1524	67	23	—	PCI	CYP2C19 gain-of-function (*17)	MACE: MI, revascularisation, death (n=56)	Stent thrombosis (n=14)	Major bleeding (n=12)	30 days	Age, sex, BMI, creatinine, use of PPIs or abciximab, clopidogrel loading interval	23/33	78.8

ACS, acute coronary syndrome; BMI, body mass index; CV, cardiovascular; MACE, major adverse cardiovascular event; MI, myocardial infarction; n/N, number of items from the STREGA recommendations that were clearly reported in the manuscript/number of items from the STREGA recommendations that could have been reported in the article; PCI, percutaneous coronary intervention; PPI, proton-pump inhibitor; STEMI, ST elevation myocardial infarction.

≥7% per year, respectively), adjustment for clinical covariates, type of patients according to the mean or proportion of classical risk factors also associated with prognosis in each study such as diabetes, hypertension, proportion of female patients, mean age and mean body mass index, and the study's score on a reporting quality scale based on the STREGA statement (compliance with <70% or ≥70% of items).

To identify studies that individually had strong effects on the pooled OR, a sensitivity analysis was performed by excluding one study at a time and calculating the OR for the remaining studies.

HRs and OR were assumed to represent the same RR. Where more than one result was given in the original report, we used that obtained under the multivariate model with the most complete adjustment for potential confounders. Where ORs or HRs were not reported, effect size estimates were calculated using genotype frequencies stratified according to the presence of the cardiovascular event of interest.

Funnel plots of effect size against SE were examined to detect the presence of publication bias.

## RESULTS

### Eligible studies

The process of selection of studies for inclusion in the meta-analysis of major adverse cardiovascular events or stent thrombosis is summarised in figure 1. The database search identified 179 unique citations, of which 87 were judged to be of potential interest on the basis of the title. On the basis of the abstract, 13 studies were reviewed in their entirety.<sup>11 23–34</sup> One was excluded because it did not meet the eligibility criteria<sup>34</sup> and a second one was excluded<sup>28</sup> because the data reported were available in a previous study already included in the meta-analysis.<sup>11</sup> One additional study<sup>35</sup> was identified after review of the references cited, and a second one after review of the manuscripts of the meta-analysis of major bleeding<sup>36</sup> (see below). Finally, 13 studies that met the criteria described above were included in the meta-analysis.

For the meta-analysis of major bleeding, we identified 36 unique citations, of which seven were judged to be of potential interest on the basis of the title. On the basis of the abstract, three articles were reviewed in their entirety,<sup>30 31 36</sup> one of them showing results from two different studies: CURE and ACTIVE A.<sup>30</sup> We also reviewed the previously identified 12 studies. Finally, four studies were included in this meta-analysis.

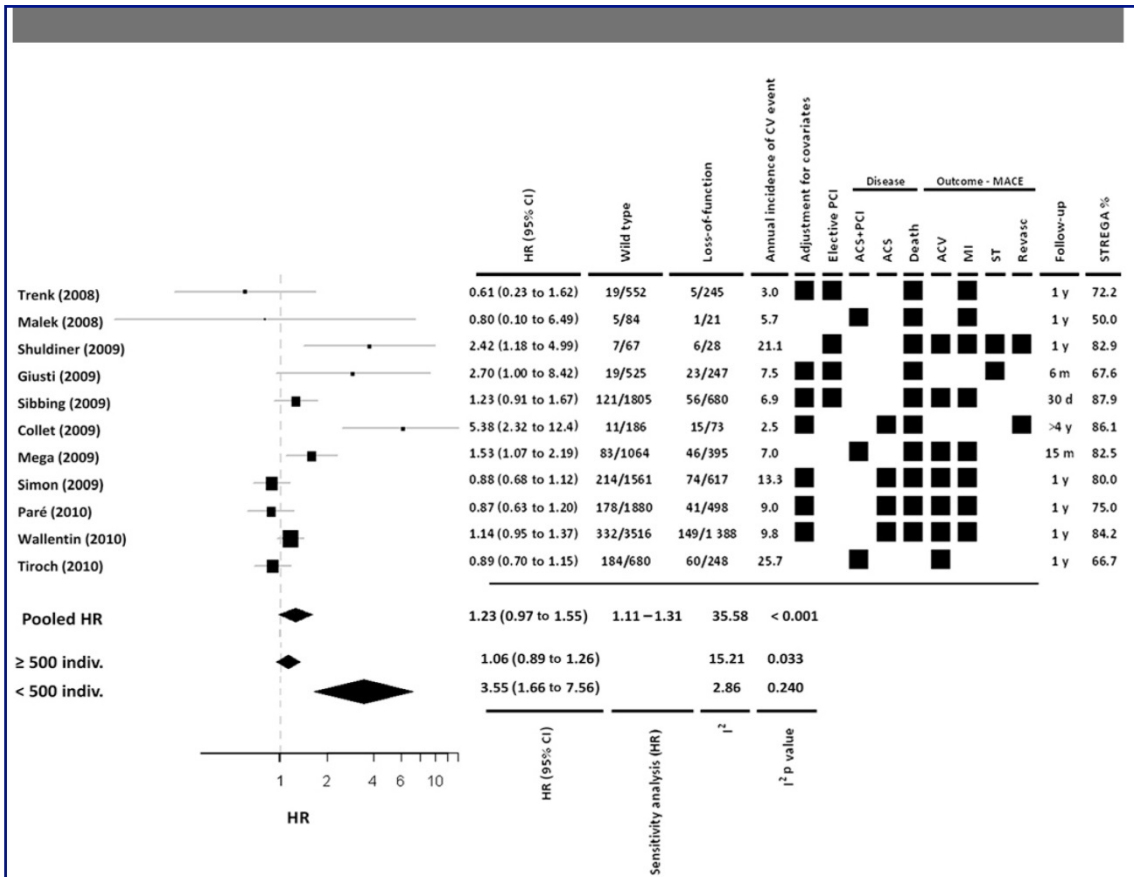
The main characteristics of these studies are shown in table 1, and the quality of the reported information according to the STREGA criteria is presented in online supplementary table 1.

### Meta-analysis

Using data from the studies described above, we performed four distinct meta-analyses according to the presence of loss- or gain-of-function alleles and the different clinical outcomes of interest. We could not perform a meta-analysis of the association between the gain-of-function alleles and stent thrombosis because only two studies analysed this association.<sup>31 36</sup> We were also unable to perform a meta-analysis of the association between the loss-of-function alleles and bleeding because only one study analysed this association.<sup>30</sup>

### Association between CYP2C19 loss-of-function alleles and cardiovascular outcomes

Eleven studies incorporating 16 360 individuals were included in this analysis. Patients that carried a loss-of-function allele, mainly CYP2C19\*2, did not have a statistically significant increased risk of a subsequent cardiovascular event (HR =1.23



**Figure 2** Risk of major cardiovascular adverse events in coronary patients treated with clopidogrel according to the presence of *CYP2C19* loss-of-function alleles and stratified by the sample size of the studies. ACS, acute coronary syndrome; ACV, acute cerebrovascular disease; CV, cardiovascular; MI, myocardial infarction; MACE, major adverse cardiovascular events; PCI, percutaneous coronary intervention; Revasc, revascularisation; ST, stent thrombosis.

(95% CI 0.97 to 1.55)) (figure 2). Sensitivity analysis indicated that no one study significantly affected the results of the meta-analysis (pooled HR ranging from 1.11 to 1.31).

We observed substantial heterogeneity between the effect sizes observed in each study ( $I^2=35.6$ ;  $p<0.001$ ). When we analyse the potential causes of this heterogeneity, only study sample size partially explained the observed heterogeneity. Therefore, we stratified the meta-analysis by sample size ( $N < 500$  or  $\geq 500$ ), and observed an increase in the pooled HR of a cardiovascular event among studies with a sample size  $< 500$  patients (HR =3.55; 95% CI 1.66 to 7.56), and loss of the previously observed association among studies with a sample size  $\geq 500$  (HR =1.06; 95% CI 0.89 to 1.26). Significant heterogeneity persisted among the larger studies ( $I^2=15.2$ ;  $p=0.033$ ) (figure 2), but not among the smaller studies ( $I^2=2.9$ ;  $p=0.240$ ) (figure 2).

The funnel plot of effect size versus SE constructed to investigate possible publication bias was slightly asymmetric, suggesting the presence of some statistical outliers among the studies included (online supplementary figure).

**Association between *CYP2C19* loss-of-function alleles and stent thrombosis**

Seven studies incorporating 8686 individuals were included in this analysis. Patients who carried a loss-of-function allele,

mainly *CYP2C19\*2*, had an increased risk of a stent thrombosis (HR =2.24; 95% CI 1.52 to 3.30;  $p<0.001$ ) (figure 3). We observed no significant heterogeneity between the reported effect sizes ( $I^2=8.8$ ;  $p=0.184$ ), and none of the studies had an individually large effect on the result of the meta-analysis (sensitivity analysis pooled HR =1.94–2.49).

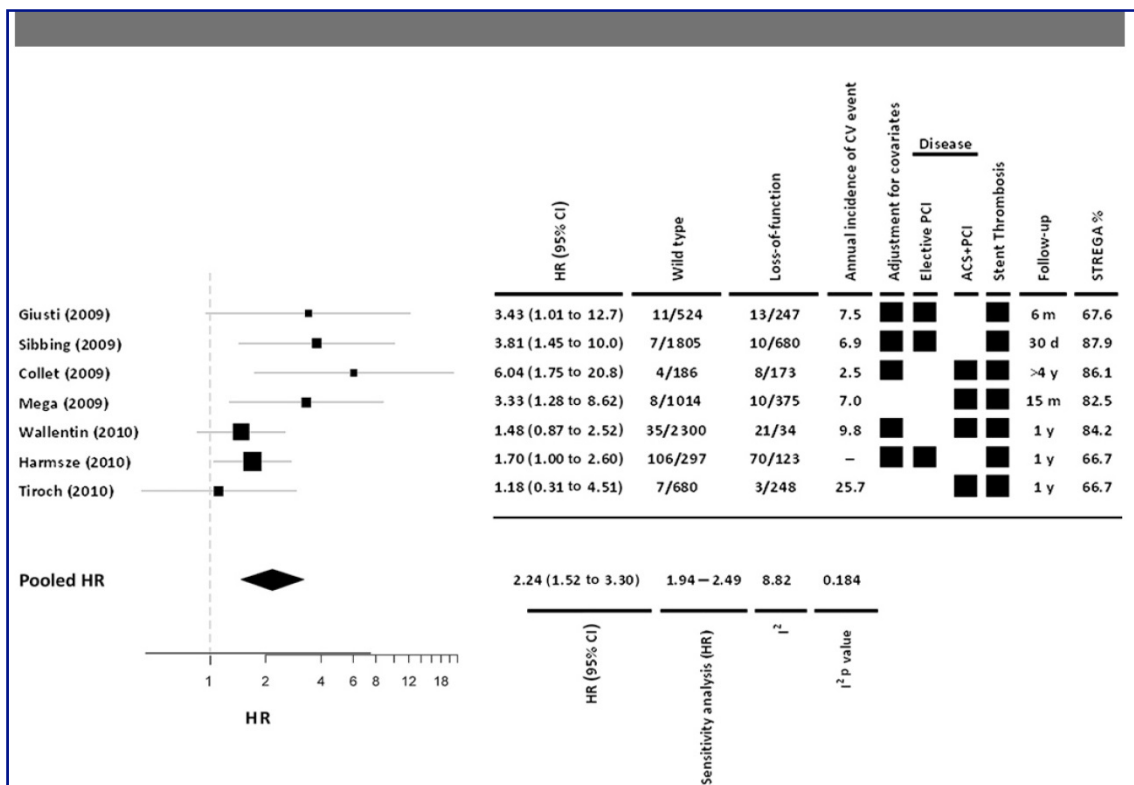
**Association between *CYP2C19* gain-of-function alleles and cardiovascular outcomes**

Four studies incorporating 6584 individuals were included in this analysis. Patients who carried a gain-of-function allele, mainly *CYP2C19\*17*, had a lower risk of clinical cardiovascular outcomes (HR =0.75; 95% CI 0.66 to 0.87;  $p<0.001$ ) (figure 4). We observed no significant heterogeneity between the reported effect sizes ( $I^2=1.16$ ;  $p=0.763$ ), and none of the studies had an individually large effect on the result of the meta-analysis (sensitivity analysis pooled HR =0.74–0.78).

**Association between *CYP2C19* gain-of-function alleles and major bleeding**

Four studies incorporating 7660 patients were included in the analysis. Patients who carried a gain-of-function allele had a higher risk of major bleeding (HR =1.26; 95% CI 1.05 to 1.50;  $p=0.011$ ) (figure 5). No significant heterogeneity between





**Figure 3** Risk of stent thrombosis in coronary patients treated with clopidogrel according to the presence of *CYP2C19* loss-of-function alleles. ACS, acute coronary syndrome; CV, cardiovascular; PCI, percutaneous coronary intervention.

studies was observed ( $I^2=0.8$ ;  $p=0.849$ ), and none of the studies had an individually large effect on the result of the meta-analysis (sensitivity analysis pooled HR ranged from 1.24 to 1.29).

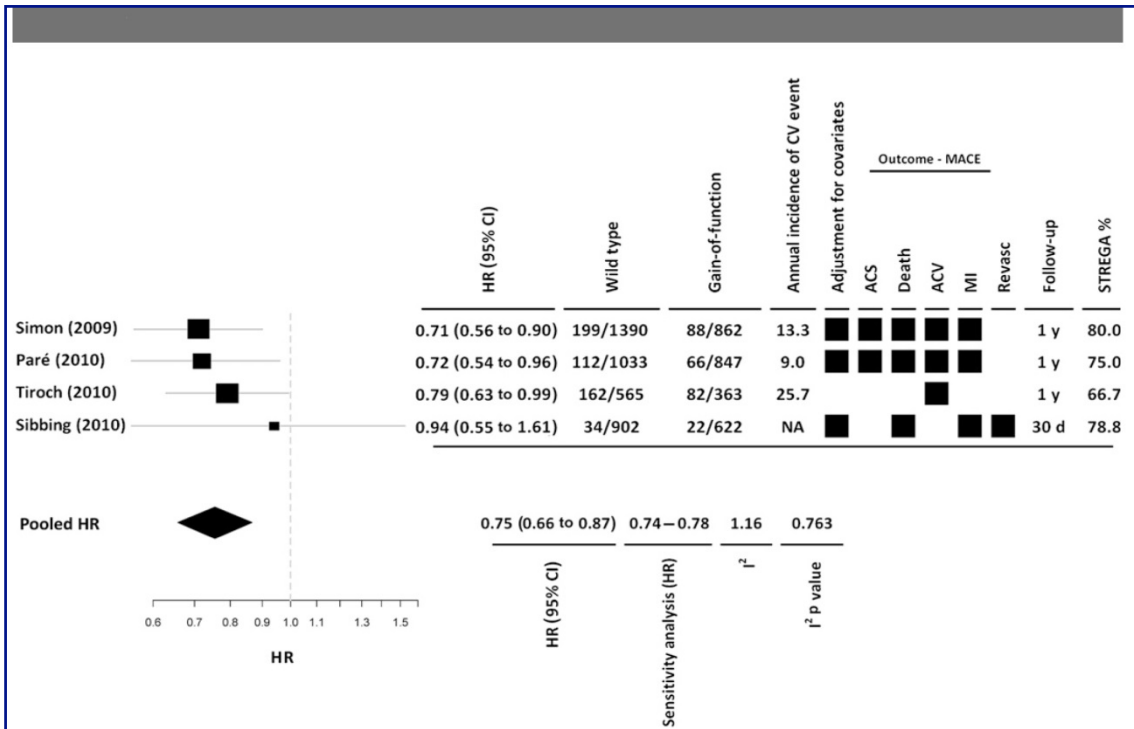
## DISCUSSION

In this study, we evaluated previous evidence regarding the association between *CYP2C19* gain- and loss-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes and major bleeding in patients with CAD taking clopidogrel. We observed high heterogeneity between studies analysing the relationship between *CYP2C19* loss-of-function alleles and major cardiovascular outcomes. This heterogeneity was partially related to study sample size: smaller studies reported a significant association between the loss-of-function alleles and a higher risk of cardiovascular outcomes, whereas no significant effect was observed in the pooled analysis of studies with a sample size  $>500$  patients. However, these loss-of-function alleles were associated with a higher risk of stent thrombosis. Moreover, the presence of a *CYP2C19* gain-of-function allele was associated with a lower risk of major cardiovascular recurrences and a higher risk of major bleeding.

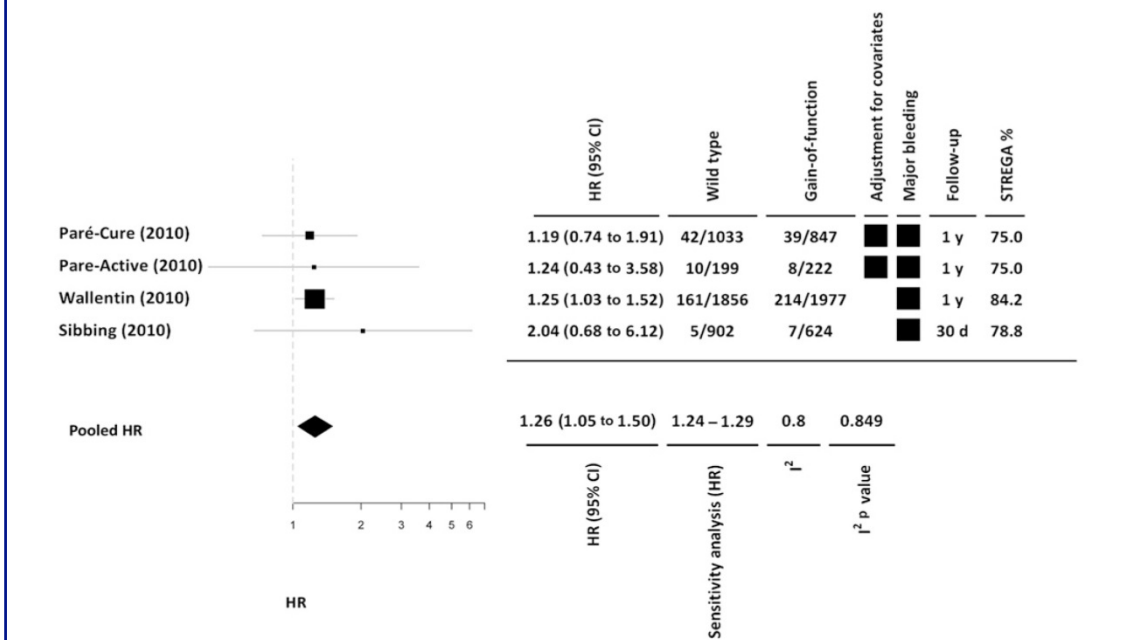
In March 2010, the US Food and Drug Administration (FDA) added a 'boxed warning' to the label of clopidogrel including a reference to patients who do not effectively metabolise the drug and therefore may not receive the full benefits on the basis of their genetic characteristics,<sup>37</sup> and more recently the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association have published a consensus document addressing this FDA warning.<sup>38</sup> This guideline states that the role of genetic

testing and the clinical implications and consequences of this testing remains to be determined.

In this study and consistent with the previous meta-analyses, we observed an association between the *CYP2C19* loss-of-function alleles and a higher stent thrombosis risk.<sup>15–17</sup> In the previously published meta-analyses, an association between the *CYP2C19* loss-of-function polymorphisms and a higher risk of major cardiovascular events was reported.<sup>15–18</sup> In our analyses we included data from four recently published studies, and when analysing all the available evidence, we did not observe an association between these alleles and cardiovascular recurrences. We conclude that a significant part of the effect size reported in previous studies is driven by the higher effect size observed in small sample size studies. Similar findings were observed in the meta-analysis performed by Hulot *et al.*<sup>17</sup> In their study, the effect size of the association between the loss-of-function alleles and cardiovascular outcomes was significantly higher in studies with a sample size  $<1000$  patients (OR =2.16; 95% CI 1.46 to 3.21) than in the studies with a sample size  $\geq 1000$  (OR =1.20; 95% CI 1.03 to 1.40). In our study, we selected a different cut point a priori to analyse the effect of small studies ( $n < 500$ ) to obtain a real estimation of the influence of such studies. We also used the cut point defined by Hulot *et al.*<sup>17</sup> and observed similar results to those reported in that study, although the cut point did not explain the heterogeneity observed among studies. The overestimation of the effect size in small genetic association studies is well known and could be related to different factors such as spurious association due to biased publication of positive results in these types of studies.<sup>39</sup>



**Figure 4** Risk of major cardiovascular adverse events in coronary patients treated with clopidogrel according to the presence of a *CYP2C19* gain-of-function allele. ACS, acute coronary syndrome; ACV, acute cerebrovascular disease; CV, cardiovascular; MACE, major adverse cardiovascular events; MI, myocardial infarction; Revasc, revascularisation.



**Figure 5** Risk of major bleeding in coronary patients treated with clopidogrel according to the presence of a *CYP2C19* gain-of-function allele.

In some studies the association between the loss-of-function allele and cardiovascular events was higher in those patients treated with PCI and stenting,<sup>29</sup> although not in others.<sup>27</sup> In our meta-analyses, most of the patients with an acute coronary event were also treated with PCI (>70%)<sup>27 29 31</sup> and stenting except in the study of Paré *et al.*,<sup>30</sup> in which only 19% were treated with PCI. Therefore, we cannot determine whether the risk of the *CYP2C19* loss-of-function allele is similar in non-stented patients.

To our knowledge, this is the first study that has meta-analysed the effect of a *CYP2C19* gain-of-function allele, *CYP2C19\*17*, on cardiovascular recurrence and major bleeding. Although we only included four studies,<sup>29 30 32 36</sup> we observed a clear protective association between this variant and major cardiovascular outcomes. This variant has also been associated with a lower risk of stent thrombosis in one study.<sup>31</sup> However, the results of our meta-analysis indicate that this variant is also associated with a higher risk of major bleeding. Therefore the balance between potential benefits and harms should be considered.

Several clinical trials have evaluated the utility of tailoring antiplatelet therapy according to genotype or platelet reactivity in coronary patients undergoing PCI.<sup>40</sup> The results of the GRAVITAS Study, a clinical trial designed to test if a high-clopidogrel dose strategy for 6 months is superior to the classical dose for the prevention of cardiovascular outcomes after PCI in patients with high residual platelet activity, has shown that the high dose strategy did not reduce the risk of further ischaemic events.<sup>41</sup> In other studies, alternative therapeutic strategies such as triple antiplatelet therapies (adding cilostazol) or other drugs also targeting the P2Y<sub>12</sub> receptor such as prasugrel are being tested. However, although the concept of platelet reactivity monitoring of response to thienopyridenes is emerging, a consensus has not yet been reached regarding the threshold of platelet reactivity that should be achieved and the method of assessing platelet reactivity that should be used.<sup>42</sup>

Our study has several limitations, which are also inherent to many meta-analyses. The retrospective nature of our meta-analysis, incorporating data from published studies and not on individual patients, limits the availability of information on some issues, such as different clinical end points, comorbidities or concomitant therapies. We observed substantial heterogeneity between the results reported by different studies, which was partly accounted for by sample size. We attempted to determine if this heterogeneity might also be explained by other variables such as the type of patient (with or without acute coronary syndrome, with or without PCI, etc) included in the different studies, but are unable to provide a reliable answer to this question because we did not have access to individual level data for these variables. Studies including a more homogeneous type of patients are warranted. Finally, in this analysis we were able to consider a dominant genetic model, but could not explore an additive model. However, in the meta-analyses described by Mega *et al.*,<sup>18</sup> it was reported that the effect size for major cardiovascular events of the presence of one loss-of-function allele (HR =1.55; 95% CI 1.11 to 1.27) was similar to that observed when two alleles were present (HR =1.76; 95% CI 1.25 to 2.50).

The results of this meta-analysis indicate that not only *CYP2C19* loss-of-function but also gain-of-function alleles should be considered to define the pharmacogenetic response to clopidogrel. The main clinical outcome related to these genetic variants is stent thrombosis. Our results question the relevance of the *CYP2C19* loss-of-function alleles on the prediction of

major cardiovascular events and bleeding in coronary patients treated with clopidogrel.

**Funding** This work was supported by Spain's Ministry of Science and Innovation through the Carlos III Health Institute - European Regional Development Fund (ERDF) (FIS PI09/90506, CIBER Epidemiología y Salud Pública, Red HERACLES RD06/0009) and by the Government of Catalonia through the Catalan Research and Technology Innovation Interdepartmental Commission (SGR 1195). GL was funded by the Juan de la Cierva Program, Ministerio de Educación. MT was funded by the Beatriu de Pinós Grant.

**Competing interests** None.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

1. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, *et al.* Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001;**345**:494–502. [Erratum published in *N Engl J Med* 2001;**345**:1506].
2. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, *et al.* Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2005;**352**:1179–89.
3. King SB 3rd, Smith SC Jr, Hirshfeld JW Jr, *et al.* 2007 Focused Update of the ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2008;**117**:261–95. [Erratum, *Circulation* 2008;**117**(6):e161].
4. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006;**27**:647–54.
5. Bliden KP, Dichiara J, Tantry US, *et al.* Increased risk in patients with high platelet aggregation receiving chronic clopidogrel therapy undergoing percutaneous coronary intervention: is the current antiplatelet therapy adequate? *J Am Coll Cardiol* 2007;**49**:657–66.
6. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, *et al.* Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2007;**49**:1505–16.
7. Savi P, Combalbert J, Gaich C, *et al.* The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 1994;**72**:313–17.
8. Savi P, Perelle JM, Uzabiaga MF, *et al.* Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000;**84**:891–6.
9. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;**409**:202–7.
10. Kim KA, Park PW, Hong SJ, *et al.* The effect of *CYP2C19* polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel: a possible mechanism for clopidogrel resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2008;**84**:236–42.
11. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, *et al.* Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009;**360**:354–62.
12. Hulot JS, Bura A, Villard E, *et al.* Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006;**108**:2244–7.
13. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, *et al.* Common polymorphisms of *CYP2C19* and *CYP2C9* affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 2007;**5**:2429–36.
14. Frère C, Cuisset T, Morange PE, *et al.* Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2008;**101**:1088–93.
15. Sofi F, Giusti B, Marcucci R, *et al.* Cytochrome P450 2C19(\*12) polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2011;**11**:199–206.
16. Jin B, Ni HC, Shen W, *et al.* Cytochrome P450 2C19 polymorphism is associated with poor clinical outcomes in coronary artery disease patients treated with clopidogrel. *Mol Biol Rep* 2011;**38**:1697–702.
17. Hulot JS, Collet JP, Silvain J, *et al.* Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C19\*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;**56**:134–43.
18. Mega JL, Simon T, Collet JP, *et al.* Reduced-function *CYP2C19* genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI. *JAMA* 2010;**304**:1821–30.
19. Little J, Higgins JPT, Ionidis JPA, *et al.* Strengthening the reporting of genetic association studies (STREGA): an extension of the STROBE statement. *Ann Intern Med* 2009;**150**:206–15.
20. Lluís-Ganella C, Lucas G, Subirana I, *et al.* Qualitative assessment of previous evidence and an updated meta-analysis confirms lack of association between the ESR1 rs2234693 (PvuII) variant and coronary heart disease in men and women. *Atherosclerosis* 2009;**207**:480–6.
21. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Controlled Clinical Trials* 1986;**7**:177–88.
22. Berkley CS, Hoaglin DC, Mosteller F, *et al.* A random-effects regression model for meta-analysis. *Statistics in Medicine* 1995;**14**:395–411.
23. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, *et al.* Cytochrome P450 2C19 681G\_A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse

- 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or baremetal stents. *J Am Coll Cardiol* 2008;**51**:1925–34.
24. **Shuldiner AR**, O'Connell JR, Bliden KP, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 2009;**302**:849–57.
  25. **Giusti B**, Gori AM, Marcucci R, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics* 2007;**17**:1057–64.
  26. **Sibbing D**, Stegherr J, Latz W, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2009;**30**:916–22.
  27. **Collet JP**, Hulot JS, Pena A, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 2009;**373**:309–17.
  28. **Mega JL**, Close SL, Wiviott SD, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* 2010;**376**:1312–19.
  29. **Simon T**, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009;**360**:363–75.
  30. **Paré G**, Mehta SR, Yusuf S, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med* 2010;**363**:1704–14.
  31. **Wallentin L**, James S, Storey RF, et al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet* 2010;**376**:1320–8.
  32. **Tiroch KA**, Sibbing D, Koch W, et al. Protective effect of the CYP2C19 \*17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am Heart J* 2010;**160**:506–12.
  33. **Harmsze AM**, van Werkum JW, Ten Berg JM, et al. CYP2C19\*2 and CYP2C19\*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study. *Eur Heart J* 2010;**31**:3046–53.
  34. **Brackbill ML**, Kidd RS, Abdo AD, et al. Frequency of CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, and CYP2C19 variant alleles in patients receiving clopidogrel that experience repeat acute coronary syndrome. *Heart Vessels* 2009;**24**:73–8.
  35. **Malek LA**, Kiesel B, Spiewak M, et al. Coexisting polymorphisms of P2Y12 and CYP2C19 genes as a risk factor for persistent platelet activation with clopidogrel. *Circ J* 2008;**72**:1165–9.
  36. **Sibbing D**, Koch W, Gebhard D, et al. Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 2010;**121**:512–18.
  37. **FDA Drug Safety Communication: reduced effectiveness of Plavix (clopidogrel) in patients who are poor metabolizers of the drug.** <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm190836.htm> (accessed 3 Aug 2010).
  38. **Holmes DR Jr**, Dehmer GJ, Kauls S, et al. ACCF/AHA Clopidogrel Clinical Alert: Approaches to the FDA "Boxed Warning". *Circulation* 2010;**122**:537–57.
  39. **Chanock SJ**, Manolio T, Boehnke M, et al; NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 2007;**447**:655–60.
  40. **Kazui M**, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2010;**38**:92–9.
  41. **Gensch C**, Hoppe U, Böhm M, et al. Late-breaking clinical trials presented at the American Heart Association Congress in Chicago 2010. *Clin Res Cardiol* 2011;**100**:1–9.
  42. **Bonello L**, de Labriolle A, Scheinowitz M, et al. Emergence of the concept of platelet reactivity monitoring of response to thienopyridines. *Heart* 2009;**95**:1214–19.

# DISCUSIÓN

## 5



## 5.1 VARIANTES GENÉTICAS Y SU RELACIÓN CON LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA, LA ATEROSCLEROSIS Y SU PROGRESIÓN

La arteriosclerosis es un proceso crónico, que se inicia en edades tempranas, va progresando a lo largo de la vida del individuo, y en ocasiones origina manifestaciones clínicas como la CI. Las manifestaciones clínicas están relacionadas con que el aporte de oxígeno no cubre las demandas de un órgano o tejido, y se produce una isquemia tisular.

Básicamente, las lesiones o placas arterioscleróticas se han clasificado en estables o vulnerables. Las placas estables se caracterizan por una cubierta fibrosa densa, un núcleo lipídico pequeño y una inflamación de bajo grado. Este tipo de placa tiene poca predisposición a la rotura y, por lo tanto, a desencadenar acontecimientos agudos. Cuando producen una estenosis de la luz arterial significativa pueden ocasionar como manifestación clínica la angina de esfuerzo, la claudicación intermitente o la isquemia mesentérica. Por el contrario, las placas inestables o *vulnerables* tienen una cubierta fibrosa fina, un rico contenido lipídico y unos niveles de actividad inflamatoria local elevados. Esta inflamación local contribuye a producir la degradación de la capa fibrosa, que facilita la rotura de la placa y la trombosis aguda, que puede conducir, a su vez, a una oclusión arterial aguda, que provoque isquemia y necrosis tisular, y en el caso de las arterias coronarias el infarto agudo de miocardio.

En este contexto es importante introducir el concepto de la paradoja del sur de Europa y una de sus posibles explicaciones. Esta paradoja viene definida por la coexistencia de una alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, similar a la existente en países del norte de Europa o Estados Unidos, junto con una baja incidencia de infarto agudo de miocardio, 2-3 veces inferior en el sur de Europa comparado con el norte o Estados Unidos<sup>115</sup>. A esta definición podríamos añadir que la prevalencia de angina en el sur de Europa es similar a la del norte de Europa o Estados Unidos<sup>116</sup>. Una de las posibles explicaciones que se ha hipotetizado para explicar esta paradoja es que en el sur de Europa existe tanta arteriosclerosis como en el norte de Europa, pero ésta se manifiesta en forma de placas estables, lo que explica la similar prevalencia de angina y la menor incidencia de acontecimientos coronarios agudos<sup>117</sup>.

Esta diferencia en la progresión de la aterosclerosis y el tipo de placa podría deberse en parte a factores ambientales y/o genéticos. Entre los factores ambientales estarían la dieta y la actividad física. Los factores genéticos también podrían explicar estas diferencias: la predisposición individual a generar un tipo u otro de placa o la variabilidad en la respuesta a los fármacos destinados a estabilizar las placas ateromatosas, como las estatinas<sup>118</sup> podría estar relacionada con la variabilidad genética existente en Europa<sup>119</sup>.

Una de las estrategias en la prevención y el tratamiento de la CI puede ir dirigida a estabilizar las placas vulnerables, y así reducir el riesgo de rotura de la placa y de presentar acontecimientos coronarios agudos.

### 5.1.1 FACTORES AMBIENTALES

Los hábitos alimentarios, estilos de vida y factores socioculturales pueden tener un papel relevante en la diferente progresión de la aterosclerosis. En este sentido, se han estudiado ampliamente los efectos beneficiosos de diferentes dietas, y entre ellas la mediterránea. Aunque varía de una región a otra, en general, esta dieta se caracteriza por un consumo elevado de aceite de oliva y bajo de grasas saturadas. El aceite de oliva es rico en ácido oleico (un 55-80% de la grasa total), ácidos grasos monoinsaturados y ácido linoleico (un 5-20% de la grasa total), ácidos grasos omega-6 poliinsaturados y varios antioxidantes como los polifenoles, que podrían explicar los beneficios cardiovasculares asociados a su consumo. Estudios observacionales indican que la falta de adherencia a una dieta mediterránea puede conducir a tasas elevadas de mortalidad cardiovascular incluso en países situados en la propia cuenca del Mediterráneo<sup>120</sup>.

Por otra parte, el ensayo clínico controlado PREDIMED ha demostrado que una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen o frutos secos tiene un efecto positivo en los factores de riesgo cardiovascular en una población de riesgo cardiovascular elevado. En comparación con el grupo de control al que únicamente se recomendó un consumo moderado de grasa animal, los sujetos asignados a los dos grupos de intervención y que siguieron una dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva o frutos secos, presentaron una disminución de la presión arterial<sup>121</sup>, la resistencia a la insulina y los biomarcadores inflamatorios<sup>121</sup>, mejora de su perfil lipídico<sup>121 122</sup> y aumento de la capacidad antioxidante total del plasma. Además de los beneficios relacionados con los factores de riesgo cardiovascular, se observó una regresión de la



lesión aterosclerótica medida a través del GIMc medido en la pared distal de las arterias carótidas comunes al cabo de un año<sup>123</sup>. Pero, lo más importante es que esta dieta también ha demostrado ser eficaz para reducir la incidencia de acontecimientos cardiovasculares agudos<sup>124</sup>. En esta misma línea, el *Lyon Heart Diet Study* puso de manifiesto una disminución de la tasa de recurrencias coronarias tras un primer IM en los sujetos que seguían una dieta mediterránea en comparación con los controles<sup>125</sup>.

### 5.1.2 FACTORES GENÉTICOS

Algunas variantes genéticas podrían predisponer al desarrollo de placas de ateroscleróticas estables, mientras que otras podrían predisponer a la inestabilidad de la placa, con el consiguiente aumento del riesgo posterior de rotura, trombosis e infarto agudo de miocardio.

Un reciente estudio ha demostrado que hay variantes genéticas asociadas con el desarrollo de la aterosclerosis coronaria estable (en el gen *ADAMTS7*), mientras que otras se asocian a eventos agudos, como el infarto de miocardio (en el gen *ABO*)<sup>126</sup>.

### 5.1.3 APROXIMACIÓN UTILIZADA EN ESTA TESIS DOCTORAL

En esta tesis doctoral hemos seleccionado algunas de las variantes genéticas asociadas con la presencia de CI (en la mayor parte de los estudios con infarto agudo de miocardio) pero que no se asocian con los factores de riesgo cardiovascular clásicos. Por lo tanto, en la mayoría de los casos el mecanismo que explica la asociación con CI no es conocido. Posteriormente, hemos analizado la asociación entre estas variantes genéticas y diferentes marcadores de aterosclerosis subclínica: GIMc, ITB y rigidez arterial carotídea.

La hipótesis de este objetivo fue que pueden existir variantes genéticas asociadas con CI pero que no se asocien con arteriosclerosis subclínica, o se asocien en la dirección esperada, o incluso en una dirección opuesta a la esperada con los marcadores de aterosclerosis analizados. Este diferente patrón de posibles asociaciones podría identificar genes asociados con diferentes mecanismos de progresión de la aterosclerosis: a placas más gruesas, más estenóticas y que probablemente puedan ser estables; o placas más finas, no estenóticas, pero que pueden ser inestables y desencadenar un acontecimiento cardiovascular agudo. Este conocimiento puede ser útil para identificar mecanismos relacionados con la estabilidad /vulnerabilidad de la placa, y así identificar dianas terapéuticas destinadas a la estabilización de la placa.

#### 5.1.4 RESULTADOS

En el estudio realizado en la población del estudio REGICOR (n=2667) observamos que no hay asociación entre las nueve variantes genéticas seleccionadas asociadas a la CI, pero no a los FRCV clásicos, y las tres mediciones de la aterosclerosis subclínica utilizadas (GIMc, rigidez carotídea e ITB).

Nuestros resultados amplían lo observado en 3 estudios recientes que se han llevado a cabo con unos objetivos similares. *Conde et al* utilizaron datos de 3 estudios europeos de base comunitaria para evaluar la asociación entre 12 variantes genéticas (7 de ellas incluídas en nuestro estudio) y el GIMc de la arteria carótida común; ninguna de las variantes individuales se asoció al parámetro de interés<sup>127</sup>. *Hernesniemi et al* analizaron la asociación entre una puntuación de riesgo genético, basada en 24 SNP identificados en un GWAS como asociados a la CI (7 de ellos incluidos en nuestro estudio) y el GIMc y la elasticidad carotídea en 2 poblaciones finlandesas y en una población estadounidense. Estos autores no observaron asociación alguna con el GIMc determinado en 2 momentos diferentes (2001 y 2007) , ni con la progresión del grosor en este periodo de 6 años<sup>128</sup>. También analizaron la asociación de los diversos SNP con las mediciones de la aterosclerosis subclínica. Y aunque dos de los SNP tendían a presentar una asociación con el GIMc (*rs4977574*) o la elasticidad carotídea (*rs4773144*), estos resultados no pudieron ser replicados<sup>128</sup>. Por último, *Zhang et al* seleccionaron 10 SNP asociados con la CI (tan solo el *rs1333049* en común con nuestro estudio) y analizaron su asociación con 4 mediciones de la aterosclerosis subclínica (GIM de arteria carótida común y arteria carótida interna, presencia de placa carotídea e ITB patológico) en varias poblaciones. Los autores observaron que el *rs780094* (*GCKR*) se asociaba a la placa carotídea en la población india estadounidense, pero no en los estadounidenses de origen europeo, afroamericano o mexicano. No se observó ninguna otra asociación entre el resto de los SNP y los demás fenotipos de aterosclerosis de interés<sup>129</sup>.

Posteriormente hemos realizado una revisión sistemática y un metaanálisis de la evidencia disponible sobre estas variantes y su asociación con aterosclerosis subclínica, y observamos que tan solo el alelo de riesgo de la variante *rs1746048* del gen *CXCL12* se asociaba al GIMc en el sentido esperado. La proteína *CXCL12* se ha asociado a la estabilización de la placa<sup>130</sup> y ello podría facilitar el remodelado arterial que puede detectarse por un engrosamiento de la pared de la arteria.

En cambio, el alelo de riesgo de la variante *rs6725887* del gen *WDR12* se asocia con mayor riesgo de CI pero paradójicamente con un GIMc inferior. El gen *WDR12* codifica una proteína que

interviene en diversos procesos celulares, incluida la progresión del ciclo celular y la proliferación celular. Este alelo de riesgo podría inhibir la proliferación de las células de músculo liso, comprometer la estabilidad de la placa y aumentar el riesgo de eventos agudos sin inducir un engrosamiento de la placa.

## 5.1.5 LIMITACIONES

### 5.1.5.1 *Marcadores de aterosclerosis subclínica utilizados*

Aunque en esta tesis doctoral hemos utilizado tres diferentes mediciones de la arteriosclerosis, éste es un proceso complejo, y es posible que no hayamos podido capturar toda esta complejidad. El GIMc nos informa parcialmente sobre el remodelado arterial, la rigidez carotídea nos proporciona datos sobre el impacto funcional de la arteriosclerosis en la elasticidad vascular, y el ITB nos informa sobre la existencia de limitación del flujo distal en las extremidades inferiores.

Pueden existir cambios morfológicos (cuantitativos y cualitativos) y funcionales que no se vean reflejados a través de las mediciones realizadas. Otros marcadores de la aterosclerosis subclínica, como la presencia de placa y su composición, podrían ser más sensibles para detectar esta progresión. Algunos estudios han puesto de manifiesto el importante papel predictivo que desempeña la presencia y las características de las placas ateroscleróticas coronarias, determinados mediante tomografía computarizada como posible sustrato para los eventos coronarios<sup>131</sup>. En los últimos años, también se están desarrollando nuevas técnicas para evaluar las características cualitativas de la placa, relacionadas con su vulnerabilidad, en imágenes obtenidas mediante sonografía carotídea<sup>132</sup>.

### 5.1.5.2 *Progresión de la arteriosclerosis órgano-específica*

Otra posible explicación podría estar relacionada con la desigual progresión de la arteriosclerosis en los diferentes territorios vasculares arteriales. Bis et al<sup>133</sup> identificaron 3 variantes genéticas asociadas al GIMc y 2 asociadas a la placa carotídea en un metanálisis de 9 poblaciones participantes en el consorcio CHARGE. Sin embargo, sólo una de ellas (*rs1878406; EDNRA*) se asoció con la enfermedad coronaria en el consorcio CARDIoGRAM.

Asímismo, sólo se ha publicado un GWAS que haya tenido como objetivo identificar variantes genéticas asociadas al ITB, y que ha incluido de 21 estudios de base poblacional y más de 41 692 individuos<sup>90</sup>. En este estudio tan solo se ha identificado una variante en el cromosoma 9p21

(*rs10757269*, en *LD* con el *rs1333049*,  $R^2 = 0,87$ ) asociada con el ITB. Aunque este locus también se asocia a la CI, el resto de variantes asociadas a la CI no se asociaron al ITB.

Estos resultados podrían indicar que las variantes analizadas también podrían tener una asociación diferencial con diferentes territorios vasculares, y en concreto entre las arterias coronarias y el resto del árbol arterial.

### 5.1.5.3 Selección de las variantes analizadas en esta tesis

La selección y genotipación de las variantes a incluir en esta tesis doctoral se realizó en el año 2010, antes de la publicación de los últimos meta-análisis de los estudios de GWAS<sup>104</sup>. Estos estudios han identificado nuevas variantes genéticas asociadas con CI, muchas de ellas de forma independiente de los FRCV clásicos, que no han sido incluidas en este análisis.

Otra de las limitaciones es que las variantes seleccionadas provienen de estudios de asociación de genoma completo. Estos estudios han permitido avanzar en el conocimiento de las bases genéticas de las enfermedades complejas pero tienen algunas limitaciones:

- Permiten identificar loci (definidos como bloques de desequilibrio de ligamiento) asociados con la enfermedad en estudio, pero no la variante genética causal y en ocasiones tampoco el gen responsable.
- En los chips o *arrays* que se utilizan en estos estudios se incluyen entre 500.000 y 1.000.000 de variantes genéticas que capturan gran parte de la variabilidad genética común, pero no toda y tampoco se obtiene información sobre variantes genéticas raras.
- En la mayoría de estudios se incluyen también imputaciones de otras variantes genéticas hasta llegar a estimar 2.500.000 (si se utilizan datos del estudio HapMap) o incluso más de 10.000.000 de variantes genéticas comunes (si se utilizado datos del estudio de los 1.000 genomas). Estas imputaciones incluyen un margen de incertidumbre y error que en ocasiones no se considera en los análisis.
- Además, muchos de estos estudios son colaborativos a nivel internacional y en muchas ocasiones el fenotipo clínico no es homogéneo, ni tampoco el *array* utilizado para el genotipado.

### 5.1.6 IMPLICACIONES

Los resultados de nuestro metanálisis, y evidencias de otros estudios, sugieren que los genes *CXCL12* y *WDR12* podrían ser buenas dianas terapéuticas para desarrollar fármacos diseñados a estabilizar las placas de arteriosclerosis.

Observamos que en la asociación entre la variante genética de *WDR12* y GIMc se observó heterogeneidad entre estudios. De modo que esta asociación solo se observó en poblaciones con mayor grosor de la íntima media carotídea. Esta observación podría indicar que la proteína del gen *WDR12* actuaría en fases en las que ya existe una cierta progresión de la aterosclerosis.

Es necesario realizar estudios funcionales que confirmen esta hipótesis generada en esta tesis doctoral sobre los productos de estos genes y su relación con la vulnerabilidad de la placa de aterosclerosis. Por otra parte, también se podría analizar en las bases de datos disponibles de estudio de GWAS si estas variantes genéticas se asocian de forma diferencial con formas estables (angina, revascularización, presencia de lesiones coronarias estenóticas) o inestables (SCA) de la enfermedad coronaria.

## 5.2 VARIANTES GENÉTICAS Y SU RELACIÓN CON EL PRONÓSTICO DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA: VARIABILIDAD INTERINDIVIDUAL EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL

El clopidogrel es un profármaco que se convierte en un metabolito activo, que se une selectivamente e irreversiblemente al receptor P2Y<sub>12</sub> en la membrana plaquetaria<sup>134 135 136</sup>. La biotransformación del clopidogrel a su derivado activo requiere dos pasos oxidativos en los que intervienen isoenzimas del citocromo P450 (CYP) hepático, como *CYP2C19*, *CYP3A4/5*, *CYP1A2*, *CYP2B6* y *CYP2C9*<sup>137</sup>. El clopidogrel es muy utilizado en la práctica clínica habitual, y la doble terapia junto a la aspirina supone el tratamiento antiagregante doble estándar tras un SCA o una angioplastia coronaria percutánea, para prevenir eventos isquémicos recurrentes y otros eventos cardiovasculares<sup>138 139 140</sup>. Sin embargo, aún con el uso de esta doble terapia antiplaquetaria se presentan un número considerable de eventos isquémicos en el seguimiento de estos pacientes. Una de las posibles explicaciones es la variabilidad interindividual en la respuesta al clopidogrel<sup>141</sup>, que resulta en un incremento del riesgo de eventos isquémicos en los pacientes con una respuesta disminuida al fármaco<sup>142</sup>. Los mecanismos que producen esta pobre respuesta no están claramente definidos aunque parecen implicados factores celulares, clínicos o genéticos<sup>143</sup>.

### 5.2.1 FACTORES CELULARES

Los efectos antiagregantes plaquetarios inducidos por el clopidogrel pueden verse afectados por varios factores celulares. Por ejemplo, se ha indicado que un recambio plaquetario acelerado reduce la capacidad de respuesta al clopidogrel<sup>144</sup>. El recambio plaquetario está representado por la presencia de plaquetas reticuladas o inmaduras, que podrían tener una mayor reactividad y, por lo tanto, empeorar la respuesta al clopidogrel. La asociación entre un mayor porcentaje de plaquetas reticuladas circulantes y una menor respuesta al clopidogrel se ha observado en pacientes con CI<sup>145</sup>.

La generación del metabolito activo podría verse afectada por factores celulares como el diferente grado de actividad metabólica basal del sistema del CYP<sup>146</sup>. Además, se ha propuesto también que la regulación al alza tanto de las vías de señalización plaquetarias purinérgicas (P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>1</sub>) como de las independientes de P2Y puede estar involucrada en la variabilidad de la

respuesta al clopidogrel, sobre todo en los pacientes con diabetes mellitus, que pueden presentar uno o varios de estos trastornos celulares<sup>147 148 149</sup>.

### 5.2.2 FACTORES CLÍNICOS

Existen múltiples factores clínicos asociados a una respuesta insuficiente al clopidogrel. Entre ellos, el cumplimiento terapéutico es el más importante<sup>150</sup>, además de la posología actualmente establecida tanto de carga como de mantenimiento. Algunas características clínicas afectan también a la reactividad plaquetaria basal y a la respuesta al clopidogrel. Concretamente la edad avanzada, la insuficiencia renal, presencia de un SCA<sup>151 152</sup>, diabetes mellitus<sup>147 148 153 154</sup> o la obesidad<sup>155 156</sup> se han asociado a un efecto inferior del clopidogrel, y ello puede contribuir también a las tasas más elevadas de episodios aterotrombóticos que presentan estos subgrupos de pacientes.

Por otro lado, el sistema del CYP activa y metaboliza innumerables fármacos y sustancias que podrían interferir, en la formación hepática del metabolito activo del clopidogrel. Se ha señalado que algunos fármacos de uso frecuente en la terapéutica cardiovascular deterioran los efectos antiagregantes plaquetarios inducidos por el clopidogrel; entre estos fármacos se encuentran las estatinas lipófilas, los antagonistas del calcio y los inhibidores de la bomba de protones (IBP). Inicialmente, en estudios mecanísticos se observó una relación entre el uso de estatinas lipófilas (p. ej., simvastatina, lovastatina y atorvastatina), que son metabolizadas por isoenzimas del CYP (principalmente la *CYP3A4*), y una disminución de los efectos inhibidores producidos por el clopidogrel<sup>157 158</sup>. Sin embargo, esos resultados no fueron confirmados en otros estudios funcionales y, lo que es más importante, análisis *post-hoc* de ensayos clínicos o registros de gran tamaño no mostraron asociación alguna con una evolución clínica adversa<sup>159 160 161 162</sup>.

Con los antagonistas del calcio, principalmente las dihidropiridinas (metabolizadas por el *CYP3A4*), se ha descrito también una reducción de los efectos inhibidores del clopidogrel en la agregabilidad plaquetar, así como un empeoramiento de la evolución clínica de los pacientes con CI al combinar ambos fármacos<sup>163 164</sup>.

Recientemente se ha descrito una interacción farmacológica entre los IBP y el clopidogrel, que ha motivado una gran preocupación a causa de la frecuencia con que se combinan ambos tipos de fármacos. Los diferentes IBP comercializados son metabolizados por isoformas del CYP

(principalmente *CYP2C19* y *CYP3A4*), pero con diferentes especificidades<sup>165</sup>. Los resultados más consistentes obtenidos hasta la fecha en los estudios funcionales han sido con omeprazol, que es metabolizado principalmente por la isoenzima *CYP2C19*<sup>166 167</sup>. En un estudio a doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, el omeprazol redujo significativamente los efectos antiagregantes plaquetarios del clopidogrel en los pacientes tratados con doble terapia antiagregante plaquetaria a los que se implantó un *stent* coronario<sup>166</sup>. Otros IBP se han evaluado también en estudios funcionales, sin que se haya demostrado efecto alguno del pantoprazol o del esomeprazol en la capacidad de respuesta al clopidogrel<sup>168</sup>, mientras que con lansoprazol se ha descrito una reducción de los efectos antiagregantes plaquetarios tras el empleo de una dosis de carga de clopidogrel de 300 mg<sup>169</sup>. Los análisis de datos de estudios clínicos a gran escala, principalmente registros y análisis *post-hoc* de ensayos clínicos aleatorizados, han aportado resultados contradictorios al evaluar el efecto del tratamiento concomitante con IBP y clopidogrel en el pronóstico de los pacientes con CI. Estos resultados concuerdan con los del ensayo COGENT-1 (Clopidogrel and the Optimization of Gastrointestinal Events), el único ensayo prospectivo, aleatorizado, a doble ciego y controlado con placebo realizado hasta la fecha para comparar un IBP (omeprazol) con placebo en pacientes tratados con clopidogrel. En este estudio participaron 3.627 pacientes en los que se preveía la necesidad de un tratamiento concomitante con clopidogrel y ácido acetilsalicílico durante un mínimo de 12 meses. No se observaron diferencias en cuanto al riesgo de episodios cardiovasculares o infartos de miocardio (HR = 1,02; intervalo de confianza [IC] del 95%, 0,70-1,51) tras una mediana de seguimiento de 133 días, mientras que sí hubo un efecto beneficioso en cuanto a reducción de los efectos gastrointestinales, que era la variable de valoración principal del estudio, en los pacientes tratados con IBP (HR = 0,55;  $p < 0,007$ ).

El tabaquismo es un importante factor de riesgo de procesos cardiovasculares aterotrombóticos, y se considera que dejar de fumar es una recomendación de clase I para la prevención secundaria de episodios isquémicos en pacientes con CI<sup>170 171 172 173 174 175</sup>. El consumo de cigarrillos es también un potente inductor de la isoforma *CYP1A2*<sup>176</sup> y, por lo tanto, puede aumentar la biotransformación del clopidogrel. Algunos estudios recientes han indicado que el consumo elevado de tabaco potencia los efectos inhibidores inducidos por el clopidogrel en las plaquetas<sup>177 178</sup>, y los resultados clínicos en los pacientes fumadores tratados con clopidogrel son mejores que en no fumadores<sup>179 180</sup>. Sin embargo, un estudio mecanístico observó una asociación entre consumo de cigarrillos y una menor producción de uno de los metabolitos del clopidogrel<sup>181</sup>.



Así pues, el papel del tabaquismo en relación con los efectos del clopidogrel deberá ser investigado con mayor detalle en nuevos estudios.

### 5.2.3 FACTORES GENÉTICOS

Los estudios de farmacogenética han evaluado las variantes genéticas en diferentes genes involucrados en los efectos farmacocinéticos y farmacodinámicos del clopidogrel<sup>182</sup>. Entre ellos, se incluyen genes que codifican proteínas y enzimas que participan en la absorción y el metabolismo hepático del clopidogrel, así como genes que codifican receptores de la membrana plaquetaria.

El gen *ABCB1* codifica la glucoproteína P intestinal denominada *MDR1* (transportador de resistencia a múltiples fármacos o *multidrug resistance transporter*), que interviene en la absorción del clopidogrel. Los pacientes portadores de dos variantes alélicas del *ABCB1* pueden presentar una reducción de la generación del metabolito activo tras la administración de una dosis de carga de clopidogrel<sup>183</sup>. Simon *et al*<sup>184</sup> observaron que la presencia de estas variantes alélicas se asociaba a una tasa más alta de episodios cardiovasculares (muerte por cualquier causa, ictus no fatal e infarto de miocardio) tras 1 año de seguimiento, en pacientes con infarto agudo de miocardio tratados con clopidogrel. Sin embargo, en un estudio realizado en una población genéticamente más homogénea (Amish) y de individuos sanos, no se observó que ese mismo polimorfismo de *ABCB1* se asociara con los valores agregación plaquetaria estimulada por ADP después de 1 semana de tratamiento con clopidogrel<sup>185</sup>.

La biotransformación del clopidogrel a su derivado activo requiere la intervención de isoenzimas del citocromo P450 (CYP) hepático. Algunos estudios indican que los polimorfismos del CYP pueden ser causa, al menos en parte, de la heterogeneidad de la respuesta al clopidogrel.

Recientemente, se ha analizado la contribución *in vitro* de cada CYP, y se ha demostrado<sup>137</sup> que el metabolismo del clopidogrel depende principalmente del *CYP2C19*. Así, los alelos de pérdida de función del *CYP2C19*, como el alelo \*2, se asocian a un deterioro de la conversión del clopidogrel en su metabolito activo, una mayor reactividad plaquetaria durante el tratamiento con clopidogrel y una mala evolución clínica, en especial por el aumento del riesgo de trombosis del stent<sup>184 186 187</sup>. En cambio, el alelo *CYP2C19*\*17 implica una ganancia de función del CYP que se asocia a una potenciación de la respuesta plaquetaria al clopidogrel<sup>188</sup>. Los portadores de este alelo

\*17 podrían obtener mayor beneficio clínico que los no portadores en respuesta al tratamiento con clopidogrel<sup>189</sup>. Sin embargo, no está clara todavía la trascendencia clínica de los alelos *CYP2C19*\*2 y \*17, los análisis de diferentes series de pacientes han mostrado resultados contradictorios en cuanto a la relación entre la presencia de estos alelos de pérdida o ganancia de función y la eficacia del clopidogrel<sup>184 186 187 188 189</sup>.

En los estudios de farmacogenética se han evaluado también polimorfismos de genes que codifican receptores de la membrana plaquetaria, entre ellos: *P2YR12* (receptor P2Y<sub>12</sub> de ADP), *ITGB3* (receptor GPIIb/IIIa de fibrinógeno plaquetario), *ITGA2* (receptor GPIa de colágeno plaquetario) y *PAR-1* (receptor activado por proteasa 1, un receptor de trombina). Se ha señalado que algunas variantes de estos genes influyen en la variabilidad de respuesta al clopidogrel, aunque los resultados obtenidos hasta la fecha han sido poco consistentes<sup>190 191 192 193 194 195</sup>.

#### 5.2.4 APROXIMACIÓN UTILIZADA EN ESTA TESIS DOCTORAL

Los resultados de la asociación de variantes genéticas en el *CYP2C19* han tenido un impacto en la práctica clínica ya que en marzo de 2010, la *Food and Drug Administration* (FDA) estadounidense introdujo una advertencia en la etiqueta del clopidogrel en la que indicaba que las características genéticas del paciente podían determinar la eficacia del clopidogrel, y que su determinación podía utilizarse para valorar tratamientos alternativos en los portadores de alelos de pérdida de función del *CYP2C19*. Sin embargo, la *American College of Cardiology Foundation* y la *American Heart Association* emitieron una alerta clínica sobre la manera de abordar esta advertencia de la FDA<sup>196</sup>. Dicha alerta proporciona a los clínicos una guía matizada sobre cómo abordar esta advertencia de la etiqueta del clopidogrel y se muestra reticente ante la determinación sistemática del genotipo como ayuda para el juicio clínico, principalmente porque el tratamiento antiagregante plaquetario guiado por el genotipo no se ha estudiado en un ensayo clínico aleatorizado a gran escala. Por nuestra parte, añadiríamos que la evidencia disponible no era consistente.

En el momento de diseñar nuestro estudio ya existían cuatro metaanálisis<sup>197 198 199 200</sup> que concluían que existía una asociación significativa entre el alelo *CYP2C19*\*2 y el mayor riesgo de presentar eventos cardiovasculares adversos mayores y trombosis del stent en pacientes con enfermedad coronaria tratados con clopidogrel.

El que incluía mayor número de pacientes<sup>197</sup> (nueve estudios, con un total de 9.685 pacientes) puso de manifiesto que los pacientes portadores de 1 o 2 alelos de pérdida de función, principalmente el polimorfismo *CYP2C19*\*2, tenían un riesgo de eventos cardiovasculares superior al de los no portadores, con razón de riesgos (HR)=1,55 (p=0,01) y HR=1,76 (p=0,002), respectivamente. Por otra parte, los portadores de 1 o 2 alelos de pérdida de función de esta variante también presentaron un mayor riesgo de trombosis del *stent* con HR=2,67 (p<0,0001) y HR=3,97 (p=0,01), respectivamente<sup>197</sup>.

Sin embargo, los análisis genéticos *post-hoc* de los ensayos clínicos PLATO, CURE y ACTIVE-A<sup>200</sup> no se incluyeron en este metaanálisis. Con una población en la que solamente un 64% de los pacientes fueron tratados con ICP, en el estudio PLATO sólo se observó un efecto del alelo de pérdida de función del *CYP2C19* en los acontecimientos cardiovasculares a los 30 días (HR=1,37; p=0,028). En los estudios ACTIVE-A y CURE no se observaron asociaciones significativas. Además, existía mucha heterogeneidad entre los resultados de los diferentes estudios incluidos y las causas de esta heterogeneidad no se habían analizado.

En nuestro estudio, nos propusimos incluir los resultados de los nuevos estudios para determinar la relevancia de dichas variantes genéticas y su utilidad en la práctica clínica diaria. Por otra parte, también nos planteamos analizar las causas de la heterogeneidad de resultados entre estudios mediante análisis de metaregresión. Para ello realizamos una revisión sistemática de la evidencia disponible y un metanálisis.

### 5.2.5 RESULTADOS

En nuestro metaanálisis, hemos observado que en pacientes con CI tratados con clopidogrel la presencia del alelo con pérdida de función del *CYP2C19*\*2 no se asocia con mayor riesgo de acontecimientos cardiovasculares (11 estudios con 16.360 pacientes), pero sí con mayor riesgo de trombosis del *stent* (7 estudios con 8686 pacientes).

Por otra parte, hemos confirmado la existencia de heterogeneidad de resultados entre los estudios que han analizado la relación entre el *CYP2C19*\*2 y el riesgo de presentar acontecimientos cardiovasculares en los pacientes tratados con clopidogrel. Esta heterogeneidad está relacionada fundamentalmente con el tamaño de muestra: los estudios más pequeños muestran una asociación significativa entre los alelos de pérdida de función del *CYP2C19* y los

acontecimientos cardiovasculares, mientras que esta asociación no es significativa en los estudios con más de 500 pacientes. Por lo tanto, la magnitud de la asociación publicada en metaanálisis previos puede ser debida al mayor impacto del efecto observado en los estudios iniciales que incluyeron muestras más pequeñas. Esta conclusión es similar a la del metaanálisis de Hulot<sup>198</sup>, en su estudio la magnitud del efecto entre los alelos de pérdida de función del *CYP2C19* y los acontecimientos cardiovasculares fue significativamente mayor en estudios con menos de 1000 pacientes (OR =2.16; 95% CI 1.46 to 3.21) que en estudios con una muestra mayor de 1000 pacientes (OR=1.20; 95% CI 1.03 to 1.40). La sobreestimación de la asociación en estudios genéticos pequeños es algo bien conocido, y puede estar en relación a diferentes factores como una asociación espuria debida al sesgo de publicación de resultados positivos<sup>201</sup>.

En algunos estudios la asociación entre los alelos de pérdida de función del *CYP2C19* y acontecimientos cardiovasculares era mayor en aquellos pacientes sometidos a una angioplastia con implantación de un *stent*<sup>202</sup>. En nuestro metaanálisis la mayoría de pacientes con un síndrome coronario agudo eran tratados con angioplastia e implantación de *stent* (>70%)<sup>184 200 203</sup> excepto en el estudio de Paré<sup>189</sup> en el que sólo se sometieron a angioplastia el 19%. Por lo tanto, no pudimos estratificar el análisis para determinar si el riesgo asociado a portar un alelo con pérdida de función es similar en pacientes a los que no se les ha realizado un procedimiento de intervención coronaria percutánea con implantación de *stent* y en pacientes sin intervencionismo coronario.

Un metaanálisis posterior<sup>204</sup> concluye que el alelo con pérdida de función del *CYP2C19* se asocia con mayor riesgo de acontecimientos cardiovasculares, aunque en otro más reciente se observa que esta variante no se asocia con mayor riesgo en pacientes caucásicos no tratados con procedimientos coronarios invasivos (RR=0,99; IC 95%: 0,84-1,17); sí se asocia en caucásicos tratados con procedimientos invasivos (RR=1,20; IC 95%: 1,10-1,31) y especialmente en asiáticos que reciben este tratamiento (RR=1,91; IC 95%: 1,61-2,27)<sup>202</sup>.

La asociación entre los alelos de pérdida de función del *CYP2C19* y el mayor riesgo de trombosis de *stent* es consistente con los resultados de los metaanálisis publicados<sup>197 198</sup>. Por otra parte, no existía heterogeneidad entre los resultados observados en los diferentes estudios. Asimismo exploramos la relevancia clínica de ser portador del alelo de ganancia de función *CYP2C19*\*17. Algunos estudios han relacionado este polimorfismo con una mayor respuesta al clopidogrel<sup>189</sup> y un incremento del riesgo hemorrágico<sup>200</sup>. Hay poco consenso acerca de un posible

efecto protector sobre la ocurrencia de eventos isquémicos<sup>188</sup>. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la presencia de un alelo de ganancia de función del *CYP2C19* está relacionada con menor riesgo de acontecimientos cardiovasculares, pero con un mayor riesgo de sangrado por lo que el riesgo-beneficio debe ser considerado y evaluado a nivel individual.

### 5.2.6 LIMITACIONES

Las limitaciones son las inherentes al diseño utilizado: el metaanálisis. No hemos podido acceder a los datos individuales de los pacientes incluidos en los diferentes estudios analizados, y por lo tanto, el análisis se ha limitado al análisis de los datos agregados de cada estudio. En concreto:

- i) los acontecimientos clínicos de interés pueden ser diferentes entre estudios, o puede existir variabilidad en la definición de los mismos, y dentro de un estudio se pueden incluir pacientes con diferente perfil clínico;
- ii) las características clínicas de los pacientes pueden ser diferentes, comorbilidad, tratamientos concomitantes, procedimientos realizados, etc.
- iii) los modelos genéticos considerados en los diferentes estudios también pueden ser diferentes.

Por todo ello, no hemos podido analizar si la heterogeneidad existente entre estudios podía estar relacionada con otras variables como las características clínicas del paciente o la realización o no de un procedimiento coronario invasivo.

Por último señalar que en este estudio no hemos podido incluir datos propios de pacientes del registro hospitalario de pacientes con infarto agudo de miocardio del estudio REGICOR. Esto se debe a que el tratamiento con el fármaco de interés, clopidogrel, no se recogió de manera estandarizada durante todo el registro.

### 5.2.7 IMPLICACIONES

Nuestros resultados indican que para considerar la farmacogenética de la respuesta al clopidogrel no sólo se tienen que tener las variantes que indican pérdida de función del *CYP2C19* sino también aquellas que indican ganancia de función.

Nuestros resultados cuestionan la importancia de la variante con pérdida de función *CYP2C19* como asociada con mayor riesgo de acontecimientos cardiovasculares (a excepción de la trombosis del *stent*).

Por último, señalar también que los estudios con pequeño tamaño muestral tienden a sobreestimar la magnitud de la asociación, y por lo tanto, en estudios de farmacogenética es necesario diseñar estudios con gran tamaño muestral para obtener estimadores correctos de la magnitud de la asociación.

### 5.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

Las aproximaciones e investigaciones futuras deberán profundizar en los mecanismos de la aterosclerosis en general y de la placa aterosclerótica en particular. Un escenario que nos permita determinar cuales son las claves o signos que diferencian las placas estables de las vulnerables, y detectar qué factores precipitan la inflamación arterial y la ruptura de la placa.

Necesitaremos estudios que exploren elementos relacionados con la dieta y la actividad física, dilucidar los factores genéticos relevantes en la progresión de la aterosclerosis y el papel de los diferentes fármacos utilizados en la práctica clínica.

Otro aspecto fundamental es la utilización práctica de biomarcadores sensibles y específicos como las técnicas de imagen de alta resolución y su implementación rutinaria en los centros hospitalarios. Las técnicas de imagen, en continuo desarrollo, nos permitirán conocer con más detalle la composición de la placa aterosclerótica y sus características funcionales.

Con toda esta información en la mano, los clínicos podremos centrar nuestros esfuerzos en aquellos pacientes propensos a inestabilizarse y ser susceptibles de padecer eventos coronarios agudos.

Por otro lado las implicaciones pronósticas de la variabilidad de los efectos inducidos por el clopidogrel han llevado inevitablemente a la cuestión de cómo abordar y superar este fenómeno. Tras asegurar que el paciente cumpla el tratamiento antiagregante plaquetario y descartar posibles interacciones farmacológicas en el paciente polimedicado, se proponen nuevas estrategias personalizadas para superar la variabilidad de respuesta al clopidogrel.

Una estrategia razonable es estratificar los pacientes y evaluar, tanto el estado de portador del alelo de pérdida de función y/o ganancia de función de CYP2C19 y la función plaquetaria de los pacientes de alto riesgo tratados con clopidogrel. Estos pacientes incluirían pacientes con un SCA actual o previo, antecedentes de trombosis de *stent*, mala función ventricular izquierda, implante de *stents* en múltiples vasos, anatomía coronaria compleja, índice de masa corporal alto, diabetes mellitus, IRC y pacientes tratados simultáneamente con inhibidores de la bomba de protones. En estos pacientes también se podría plantear la utilización de un tratamiento más potente contra el

receptor P2Y<sub>12</sub>. Los datos de los ensayos TRITON-TIMI 38 y PLATO indican claramente que el prasugrel y el ticagrelor son alternativas eficaces al clopidogrel que superan la influencia del estado de portador del alelo con pérdida de función (*LoF*). Mediante la personalización del tratamiento, los clínicos podríamos identificar el fármaco antiagregante plaquetario que alcance el nivel de reactividad plaquetaria óptimo para el paciente. De este modo se optimizarían costes y complicaciones ya que los nuevos nuevos bloqueadores del receptor P2Y<sub>12</sub> se asocian a un aumento de la hemorragia si se prescriben de forma indiscriminada y son más caros.

Otra línea de investigación futura es continuar con el estudio de las bases genéticas de la cardiopatía isquémica. Las variantes genéticas identificadas hasta el día de hoy explican aproximadamente el 10% de la heredabilidad de la enfermedad, por lo que todavía falta por identificar el 90% de la heredabilidad de la cardiopatía isquémica. La búsqueda de esta “heredabilidad perdida” es uno de los retos de la actualidad, y se están utilizando diferentes estrategias:

- Nuevos consorcios que aumenten la potencia estadística para identificar nuevas variantes genéticas comunes con efectos pequeños utilizando la aproximación de estudios de asociación de genoma completo.
- Estudios de secuenciación del genoma (exoma o genoma completo), que permitan identificar variantes comunes no capturadas por los estudios de genoma completo, y variantes raras con efectos potencialmente de mayor magnitud.
- Epigenética: el estudio de histonas, RNA no codificantes (de cadena larga o corta), y la metilación del ADN también puede contribuir a esclarecer las bases genéticas de la cardiopatía isquémica.
- Por último, no podemos olvidar que la cardiopatía isquémica es una enfermedad compleja en la que el ambiente juega un papel determinante, por lo que será importante establecer colaboraciones para estudiar la compleja interacción gen-ambiente y su relación con la susceptibilidad individual para presentar la enfermedad.



# CONCLUSIONES

**6**



6.1 Las variantes genéticas analizadas y que se asocian con cardiopatía isquémica, pero no con los factores de riesgo cardiovascular, lo hacen a través de mecanismos diversos y complejos.

6.1.1 El alelo de riesgo de cardiopatía isquémica de la variante *rs1746048*, del gen *CXCL12*, se asocia directamente con el grosor de la íntima media carotídea. Esta asociación parece indicar que el gen *CXCL12* está relacionado con el remodelado arterial secundario a la progresión de la aterosclerosis.

6.1.2 El alelo de riesgo de cardiopatía isquémica de la variante *rs6725887*, del gen *WDR12*, se asocia inversamente con el grosor de la íntima media carotídea. Esta asociación podría indicar que el gen *WDR12* está relacionado con la vulnerabilidad de la placa de aterosclerosis.

6.1.2.1 Se observó heterogeneidad entre estudios, de modo que esta asociación se observó en poblaciones con mayor grosor de la íntima media carotídea.

6.1.3 Es necesario realizar estudios funcionales en modelos *in vitro* e *in vivo* para confirmar estos resultados y la relevancia de los genes *CXCL12* y *WDR12* en la aterosclerosis.

6.1.4 Las variantes genéticas *rs17465637*, *rs9818870*, *rs12526453*, *rs1333049*, *rs9982601* y el *rs10455872*, de los genes *MIA3*, *MRAS*, *PHACTR1*, *CDKN2A/2B*, *SCL5A3*, *LPA*, y el haplotipo B del gen *ALOX5AP* no se asocian con la aterosclerosis subclínica medida por el grosor de la íntima media carotídea, la rigidez carotídea o el índice tobillo brazo. Esta tesis doctoral no aporta información adicional sobre los mecanismos que pueden explicar la asociación de estas variantes con el riesgo de presentar cardiopatía isquémica.

6.2 Para considerar la farmacogenética de la respuesta al clopidogrel no sólo se tienen que tener en cuenta las variantes que indican pérdida de función del *CYP2C19* sino también aquellas que indican ganancia de función. En pacientes con cardiopatía isquémica que reciben tratamiento con clopidogrel:

6.2.1 El alelo de pérdida de función *CYP2C19\*2* no se asocia con mayor riesgo de acontecimientos cardiovasculares.

6.2.2.1 Se observó heterogeneidad entre estudios que se explicaba parcialmente por el tamaño de la muestra del estudio:

- en estudios con  $n < 500$  pacientes sí que se observaba asociación con mayor riesgo de acontecimientos cardiovasculares (aunque continuaba existiendo heterogeneidad entre ellos);
- en estudios  $n \geq 500$  pacientes no se observa asociación con mayor riesgo de acontecimientos cardiovasculares (no existía heterogeneidad entre estudios).

6.2.2 El alelo de pérdida de función *CYP2C19\*2* se asocia con mayor riesgo de trombosis del stent.

6.2.3 El alelo de ganancia de función *CYP2C19\*17* se asocia con menor riesgo de acontecimientos cardiovasculares.

6.2.4 El alelo de ganancia de función *CYP2C19\*17* se asocia con mayor riesgo de sangrado.

# BIBLIOGRAFÍA

7



- <sup>1</sup> Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380:2197-223.
- <sup>2</sup> Dégano IR, Elosua R, Marrugat J. Epidemiología del síndrome coronario agudo en España: estimación del número de casos y la tendencia de 2005 a 2049. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:472-81.
- <sup>3</sup> Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015; 131:e29-322.
- <sup>4</sup> Wilkins JT, Ning H, Berry J, Zhao L, Dyer AR, Lloyd-Jones DM. Lifetime risk and years lived free of total cardiovascular disease. *JAMA*. 2012;308:1795-801.
- <sup>5</sup> Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network, Brussels and European Society of Cardiology. Sophia Antipolis. 2012.
- <sup>6</sup> Ferreira I. Epidemiología de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol*. 2014;67:139-44.
- <sup>7</sup> Mecchia D, Lavezzi AM, Mauri M, Matturri L. Feto-placental atherosclerotic lesions in intrauterine fetal demise: role of parental cigarette smoking. *Open Cardiovasc Med J*. 2009;3:51-56.
- <sup>8</sup> Ross E. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
- <sup>9</sup> Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:189-218.
- <sup>10</sup> Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516.
- <sup>11</sup> Sanz J, Moreno P, Fuster V. The year in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2013;24(62):1131-1143.
- <sup>12</sup> Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 2013;339:166-172.
- <sup>13</sup> Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ*. 2013;22:399-411.
- <sup>14</sup> Ghattas A, Griffiths HR, Devitt A, Lip GY, Shantsila E. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:1541-1551.
- <sup>15</sup> Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-325.
- <sup>16</sup> Witztum JL, Lichtman AH. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:73-102.
- <sup>17</sup> Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2045-2051.
- <sup>18</sup> Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:36-46.

- <sup>19</sup> Doyle B, Caplice N. Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:2073–2080
- <sup>20</sup> Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C13-8.
- <sup>21</sup> Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1282–1292.
- <sup>22</sup> Nair A, Kuban BD, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Nissen SE, Vince DG. Coronary plaque classification with intravascular ultrasound radiofrequency data analysis. *Circulation.* 2002; 106:2200-6.
- <sup>23</sup> Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004; 291:1071-80.
- <sup>24</sup> Gonzalo N, Garcia-Garcia HM, Regar E, Barlis P, Wentzel J, Onuma Y, et al. In vivo assessment of high-risk coronary plaques at bifurcations with combined intravascular ultrasound and optical coherence tomography. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2009; 2:473-82.
- <sup>25</sup> Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, Weinstein SR, Mosler TP, Tseng PH, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49:1860-70.
- <sup>26</sup> Raggi P, Gongora MC, Gopal A, Callister TQ, Budoff M, Shaw LJ. Coronary artery calcium to predict all-cause mortality in elderly men and women. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52:17-23.
- <sup>27</sup> Rosen BD, Fernandes V, McClelland RL, Carr JJ, Detrano R, Bluemke DA, et al. Relationship between baseline coronary calcium score and demonstration of coronary artery stenoses during follow-up MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *JACC Cardiovasc Imaging.* 2009; 2:1175-83.
- <sup>28</sup> Sarwar A, Shaw LJ, Shapiro MD, Blankstein R, Hoffman U, Cury RC, et al. Diagnostic and prognostic value of absence of coronary artery calcification. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2009; 2:675-88.
- <sup>29</sup> Schenker MP, Dorbala S, Hong EC, Rybicki FJ, Hachamovitch R, Kwong RY, et al. Interrelation of coronary calcification, myocardial ischemia, and outcomes in patients with intermediate likelihood of coronary artery disease: a combined positron emission tomography/computed tomography study. *Circulation.* 2008; 117:1693-700.
- <sup>30</sup> Henneman MM, Schuijf JD, Pundziute G, Van Werkhoven JM, Van der Wall EE, Jukema JW, et al. Noninvasive evaluation with multislice computed tomography in suspected acute coronary syndrome: plaque morphology on multislice computed tomography versus coronary calcium score. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52:216-22.
- <sup>31</sup> McEvoy JW, Blaha MJ, Defilippis AP, Budoff MJ, Nasir K, Blumenthal RS, et al. Coronary artery calcium progression: an important clinical measurement? A review of published reports. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 56:1613-22.
- <sup>32</sup> Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA.* 2004; 291:210-5.



- <sup>33</sup> Baber U, Mehran R, Sartori S, Schoos MM, Sillesen H, Muntendam P et al. Prevalence, Impact, and Predictive Value of Detecting Subclinical Coronary and Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Adults: The BioImage Study. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1065-74.
- <sup>34</sup> Gepner AD, Young R, Delaney JA, Tattersall MC, Blaha MJ, Post WS et al. Comparison of coronary artery calcium presence, carotid plaque presence, and carotid intima-media thickness for cardiovascular disease prediction in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2015;8.
- <sup>35</sup> Gronewold J, Bauer M, Lehmann N, Mahabadi AA, Kälsch H, Weimar C et al. Coronary artery calcification, intima-media thickness, and ankle-brachial index are complementary stroke predictors. *Stroke*. 2014;45:2702-9.
- <sup>36</sup> Raggi P, Davidson M, Callister TQ, Welty FK, Bachmann GA, Hecht H, et al. Aggressive versus moderate lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic postmenopausal women: Beyond Endorsed Lipid Lowering with EBT Scanning (BELLES). *Circulation*. 2005; 112:563-71.
- <sup>37</sup> Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005; 23:233-46.
- <sup>38</sup> Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:80-90.
- <sup>39</sup> Halcox JP, Donald AE, Ellins E, Witte DR, Shipley MJ, Brunner EJ, et al. Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. *Circulation*. 2009; 119:1005-12.
- <sup>40</sup> Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1995; 332:481-7.
- <sup>41</sup> Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, et al. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009; 120:502-9.
- <sup>42</sup> Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation*. 2007; 115:2390-7.
- <sup>43</sup> Frick M, Suessenbacher A, Alber HF, Dichtl W, Ulmer H, Pachinger O, et al. Prognostic value of brachial artery endothelial function and wall thickness. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:1006-10.
- <sup>44</sup> Feinstein SB. Contrast ultrasound imaging of the carotid artery vasa vasorum and atherosclerotic plaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:236-43.
- <sup>45</sup> Granada JF, Feinstein SB. Imaging of the vasa vasorum. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008; 5(Suppl 2):S18-25.
- <sup>46</sup> Corti R, Fayad ZA, Fuster V, Worthley SG, Helft G, Chesebro J, et al. Effects of lipid-lowering by simvastatin on human atherosclerotic lesions: a longitudinal study by high-resolution, noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2001; 104:249-52.

- <sup>47</sup> Corti R, Fuster V, Fayad ZA, Worthley SG, Helft G, Smith D, et al. Lipid lowering by simvastatin induces regression of human atherosclerotic lesions: two years' follow-up by high-resolution noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2002; 106:2884-7.
- <sup>48</sup> Corti R, Fuster V, Fayad ZA, Worthley SG, Helft G, Chaplin WF, et al. Effects of aggressive versus conventional lipid-lowering therapy by simvastatin on human atherosclerotic lesions: a prospective, randomized, double-blind trial with high-resolution magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:106-12.
- <sup>49</sup> Lee JM, Robson MD, Yu LM, Shirodaria CC, Cunnington C, Kylintireas I, et al. Effects of high-dose modified-release nicotinic acid on atherosclerosis and vascular function: a randomized, placebo-controlled, magnetic resonance imaging study. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54:1787-94.
- <sup>50</sup> Nahrendorf M, Keliher E, Panizzi P, Zhang H, Hembrador S, Figueiredo JL, et al. 18F-4V for PET-CT imaging of VCAM-1 expression in atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009; 2:1213-22.
- <sup>51</sup> Fujimoto S, Hartung D, Ohshima S, Edwards DS, Zhou J, Yalamanchili P, et al. Molecular imaging of matrix metalloproteinase in atherosclerotic lesions: resolution with dietary modification and statin therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52:1847-57.
- <sup>52</sup> Kastelein JJ, Akdim F, Stroes ES, Zwinderman AH, Bots ML, Stalenhoef AF, Visseren FL, Sijbrands EJ, Trip MD, Stein EA, Gaudet D, Duivenvoorden R, Veltri EP, Marais AD, de Groot E; ENHANCE Investigators. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2008 Apr 3;358(14):1431-43.
- <sup>53</sup> Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol*. 1997; 146:483-94.
- <sup>54</sup> Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997; 96:1432-7.
- <sup>55</sup> O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults, Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1999; 340:14-22.
- <sup>56</sup> Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007; 115:459-67.
- <sup>57</sup> Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, Lee JK, Grace KA. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation*. 2004; 110:3512-7.
- <sup>58</sup> Taylor AJ, Villines TC, Stanek EJ, Devine PJ, Griffen L, Miller M, et al. Extended-release niacin or ezetimibe and carotid intima-media thickness. *N Engl J Med*. 2009; 361:2113-22.
- <sup>59</sup> Plantinga Y, Dogan S, Grobbee DE, Bots ML. Carotid intima-media thickness measurement in cardiovascular screening programmes. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009; 16:639-44.
- <sup>60</sup> Simon A, Megnien JL, Chironi G. The value of carotid intima-media thickness for predicting cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30:182-5.

- <sup>61</sup> Lorenz MW, Schaefer C, Steinmetz H, Sitzer M. Is carotid intima media thickness useful for individual prediction of cardiovascular risk? Ten-year results from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Eur Heart J*. 2010; 31:2041-8.
- <sup>62</sup> Plichart M, Celermajer DS, Zureik M, Helmer C, Jouven X, Ritchie K, et al. Carotid intima-media thickness in plaque-free site, carotid plaques and coronary heart disease risk prediction in older adults. The Three-City Study. *Atherosclerosis*. 2011; 219:917-24.
- <sup>63</sup> Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery disease events: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2012; 220:128-33.
- <sup>64</sup> Nambi V, Chambless L, He M, Folsom AR, Mosley T, Boerwinkle E, et al. Common carotid artery intima-media thickness is as good as carotid intima-media thickness of all carotid artery segments in improving prediction of coronary heart disease risk in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Eur Heart J*. 2012 Jan;33(2):183-90.
- <sup>65</sup> Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, et al. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease risk: the ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) study. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 55:1600-7.
- <sup>66</sup> Perk J et al; European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*. 2012 Jul;33(13):1635-701.
- <sup>67</sup> Goff DC Jr et al; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014 Jun 24;129(25 Suppl 2):S49-73.
- <sup>68</sup> Neiva Neto EC, Piatto MJ, Paschoa AF, De Barros Godoy I, Shlaad SW, Van Bellen B. Intima-media thickness: correlation between carotids, vertebral artery, aorta and femoral arteries. *Int Angiol*. 2014 Oct 6. (pub ahead of print).
- <sup>69</sup> Baker JD, Dix DE. Variability of Doppler ankle pressures with arterial occlusive disease: an evaluation of ankle index and brachial-ankle pressure gradient. *Surgery*. 1981; 89:134-7.
- <sup>70</sup> Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*. 2006; 113:e463-654.
- <sup>71</sup> Smith SC, Greenland P, Grundy SM. AHA Conference Proceedings. Prevention conference V: Beyond secondary prevention: Identifying the high-risk patient for primary prevention: executive summary. American Heart Association. *Circulation*. 2000; 101:111-6.

- <sup>72</sup> Resnick HE, Lindsay RS, McDermott MM, Devereux RB, Jones KL, Fabsitz RR, Howard BV. Relationship of high and low ankle brachial index to all-cause and cardiovascular disease mortality: the Strong Heart Study. *Circulation*. 2004 Feb 17;109(6):733-9.
- <sup>73</sup> Doobay AV, Anand SS. Sensitivity and specificity of the ankle-brachial index to predict future cardiovascular outcomes: a systematic review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1463-9.
- <sup>74</sup> Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, Heald CL, Lee RJ, Chambless LE, et al. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA*. 2008; 300:197-208.
- <sup>75</sup> Eldrup N, Sillesen H, Prescott E, Nordestgaard BG. Ankle brachial index, C-reactive protein, and central augmentation index to identify individuals with severe atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2006; 27:316-22.
- <sup>76</sup> Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, Heald CL, Lee RJ, Chambless LE, et al., Ankle Brachial Index Collaboration. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA*. 2008;300:197–208.
- <sup>77</sup> Baena-Díez JM, Alzamora MT, Forés R, Pera G, Torán P, Sorribes M; ARTPER study. Ankle-brachial index improves the classification of cardiovascular risk: PERART/ARTPER Study. *Rev Esp Cardiol*. 2011 Mar;64(3):186-92.
- <sup>78</sup> Vlachopoulos C, Alexopoulos N, Stefanadis C. Aortic stiffness: prime time for integration into clinical practice? *Hellenic J Cardiol*. 2010;51:385-90.
- <sup>79</sup> Sutton-Tyrrell K, Najjar SS, Boudreau RM, Venkitachalam L, Kupelian V, Simonsick EM, et al. Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well-functioning older adults. *Circulation*. 2005;111:3384-90.
- <sup>80</sup> Wang KL, Cheng HM, Sung SH, Chuang SY, Li CH, Spurgeon HA, et al. Wave reflection and arterial stiffness in the prediction of 15-year all-cause and cardiovascular mortalities: a community-based study. *Hypertension*. 2010;55:799-805.
- <sup>81</sup> Dijk JM, Algra A, van der Graaf Y, Grobee DE; SMART study group. Carotid stiffness and the risk of new vascular events in patients with manifest cardiovascular disease. The SMART study. *Eur Heart J*. 2005;26:1213-20.
- <sup>82</sup> Safar ME, Blacher J, Jankowski P. Arterial stiffness, pulse pressure, and cardiovascular disease—is it possible to break the vicious circle? *Atherosclerosis* 2011;218: 263–271.
- <sup>83</sup> Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ. Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2010;121:505–511.
- <sup>84</sup> Samani NJ et al. WTCCC and the Cardiogenics Consortium. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2007;357:443–453.
- <sup>85</sup> Helgadottir A et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 2007;316:1491–1493.

- <sup>86</sup> McPherson R et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316:1488–1491.
- <sup>87</sup> Schunkert H et al. Cardiogenics Consortium. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation*. 2008;117:1675–1684.
- <sup>88</sup> O'Donnell CJ et al ; CARDIoGRAM Consortium. Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction. *Circulation*. 2011;124:2855–2864.
- <sup>89</sup> Cluett C et al. The 9p21 myocardial infarction risk allele increases risk of peripheral artery disease in older people. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2:347–353.
- <sup>90</sup> Murabito JM et al. Association between chromosome 9p21 variants and the ankle-brachial index identified by a metaanalysis of 21 genome-wide association studies. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:100–112.
- <sup>91</sup> Helgadóttir A et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet*. 2008;40:217–224.
- <sup>92</sup> Schunkert H et al; CARDIoGRAM Consortium. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011;43:333–338.
- <sup>93</sup> Erdmann J et al. Genome-wide association study identifies a new locus for coronary artery disease on chromosome 10p11.23. *Eur Heart J*. 2011;32:158–168.
- <sup>94</sup> Lu X, et al. Coronary ARtery DIsease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Consortium. Genome-wide association study in Han Chinese identifies four new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2012;44:890–894.
- <sup>95</sup> Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011;43:339–344.
- <sup>96</sup> Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ. Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J*. 2010;31:918–925.
- <sup>97</sup> Kathiresan S et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet*. 2009;41:334–341.
- <sup>98</sup> Ellis KL, et al. Genomic risk variants at 1p13.3, 1q41, and 3q22.3 are associated with subsequent cardiovascular outcomes in healthy controls and in established coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:636–646.
- <sup>99</sup> Lobato RL, White WD, Mathew JP, Newman MF, Smith PK, McCants CB, Alexander JH, Podgoreanu MV; Duke Perioperative Genetics and Safety Outcomes (PEGASUS) Investigative Team. Thrombomodulin gene variants are associated with increased mortality after coronary artery bypass surgery in replicated analyses. *Circulation*. 2011;124(suppl):S143–S148.
- <sup>100</sup> Westaway SK, Reinier K, Huertas-Vazquez A, Evanado A, Teodorescu C, Navarro J, Sinner MF, Gunson K, Jui J, Spooner P, Kaab S, Chugh SS. Common variants in CASQ2, GPD1L, and NOS1AP are significantly associated with risk of sudden death in patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:397–402.

- <sup>101</sup> Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, et al. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet.* 2009;41:280-2.
- <sup>102</sup> Tregouet DA, König IR, Erdmann J, Munteanu A, Braund PS, Hall AS et al. Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2009;41:283-5.
- <sup>103</sup> Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2011;43:339-44.
- <sup>104</sup> CARDIoGRAMplusC4D Consortium. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45:25-33.
- <sup>105</sup> Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, Langenberger D, Scholz M, Krohn K, et al. Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003588.
- <sup>106</sup> Cunnington MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B. Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression. *PLoS Genet.* 2010;6:e1000899.
- <sup>107</sup> Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gäbel G, Bergert H, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:620-7.
- <sup>108</sup> Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Mohlke KL, Ibrahim JG, Thomas NE, Sharpless NE. INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS One.* 2009;4:e5027.
- <sup>109</sup> Dadu RT, Ballantyne CM. Lipid lowering with PCSK9 inhibitors. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11:563-75.
- <sup>110</sup> Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-6.
- <sup>111</sup> Kalow W, Tang B, Endrenyi L. Hypothesis: Comparisons of inter-and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics.* 1998;8:283-9.
- <sup>112</sup> Weinshilboum R, Wang L. Pharmacogenetics and pharmaco-genomics: Development, science, and translation. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:223-45.
- <sup>113</sup> Wang L, HL M, Weinshilboum R. Genomics and drug response. *N Engl J Med.* 2011;364:1144-53.
- <sup>114</sup> Fuster V, Sweeny J. Clopidogrel and the reduced-function CYP2C19 genetic variant: a limited piece of the overall therapeutic puzzle. *JAMA.* 2010;304:1839-40.
- <sup>115</sup> Masiá R, Pena A, Marrugat J, Sala J, Vila J, Pavesi M, Covas M, Aubó C, Elosua R. High prevalence of cardiovascular risk factors in Gerona, Spain, a province with low myocardial infarction incidence. REGICOR Investigators. *J Epidemiol Community Health.* 1998 Nov;52(11):707-15.
- <sup>116</sup> Hemingway H, Langenberg C, Damant J, Frost C, Pyorala K, Barrett-Connor E. Prevalence of angina in women versus men: a systematic review and meta-analysis of International variations across 31 countries. *Circulation.* 2008; 117:1526-36.

- <sup>117</sup> Dégano IR, Elosua R, Kaski JC, Fernández-Bergés DJ, Grau M, Marrugat J. Plaque stability and the southern European paradox. *Rev Esp Cardiol.* 2013;66:56-62.
- <sup>118</sup> Chasman DI, Giulianini F, MacFadyen J, Barratt BJ, Nyberg F, Ridker PM. Genetic determinants of statin-induced low-density lipoprotein cholesterol reduction: the Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012; 5:257-64.
- <sup>119</sup> Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko AR, Auton A, et al. Genes mirror geography within Europe. *Nature.* 2008;456:98-101.
- <sup>120</sup> Helsing E. Traditional diets and disease patterns of the Mediterranean, circa 1960. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61:S1329-37.
- <sup>121</sup> Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *Proc Nutr Soc.* 2010; 69:333-40.
- <sup>122</sup> Fitó M, Guxens M, Corella D, Sáez G, Estruch R, De la Torre R, et al, PREDIMED Study Investigators. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med.* 2007; 167:1195-203.
- <sup>123</sup> Murie-Fernandez M, Irimia P, Toledo E, Martínez-Vila E, Buil-Cosiales P, Serrano-Martínez M, et al, PREDIMED Investigators. Carotid intima-media thickness changes with Mediterranean diet: a randomized trial (PREDIMED-Navarra). *Atherosclerosis.* 2011; 219:158-62.
- <sup>124</sup> Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med.* 2013 Apr 4;368(14):1279-90.
- <sup>125</sup> de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 1999;99:779-85.
- <sup>126</sup> Reilly MP, Li M, He J, Ferguson JF, Stylianou IM, Mehta NN, et al. Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. *Lancet.* 2011;377:383-92.
- <sup>127</sup> Conde L, Bevan S, Sitzer M, Klopp N, Illig T, Thiery J, et al. Novel associations for coronary artery disease derived from genome wide association studies are not associated with increased carotid intima-media thickness, suggesting they do not act via early atherosclerosis or vessel remodelling. *Atherosclerosis.* 2011;219:684-9.
- <sup>128</sup> Hernesniemi JA, Seppälä I, Lyytikäinen LP, Mononen N, Oksala N, Hutri-Kähönen N, et al. Genetic Profiling Using Genome-Wide Significant Coronary Artery Disease Risk Variants Does Not Improve the Prediction of Subclinical Atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Bogalusa Heart Study and the Health 2000 Survey – A Meta-Analysis of Three Independent Studies. *PLoS One.* 2012;7:e28931.
- <sup>129</sup> Zhang L, Buzkova P, Wassel CL, Roman MJ, North KE, Crawford DC, et al. Lack of associations of ten candidate coronary heart disease risk genetic variants and subclinical atherosclerosis in four U.S.

populations: The Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) study. *Atherosclerosis*. 2013;228:390-9.

<sup>130</sup> Akhtar S, Gremse F, Kiessling F, Weber C, Schober A. CXCL12 promotes the stabilization of atherosclerotic lesions mediated by smooth muscle progenitor cells in Apoe-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:679-86. Erratum in: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:e125.

<sup>131</sup> Descalzo M, Leta R, Rosselló X, Alomar X, Carreras F, Pons-Lladó G. Enfermedad coronaria subclínica por tomografía computarizada multidetector en población asintomática estratificada por nivel de riesgo coronario. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66:504-5.

<sup>132</sup> Coll B, Nambi V, Feinstein SB. New advances in noninvasive imaging of the carotid artery: CIMT, contrast-enhanced ultrasound, and vasa vasorum. *Curr Cardiol Rep*. 2010;12:497-502.

<sup>133</sup> Bis JC, Kavousi M, Franceschini N, Isaacs A, Abecasis GR, Schminke U, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE consortium identifies common variants associated with carotid intima media thickness and plaque. *Nat Genet*. 2011;43:940-7.

<sup>134</sup> Savi P, Combalbert J, Gaich C, et al. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 1994;72:313e17.

<sup>135</sup> Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000;84:891e6.

<sup>136</sup> Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;409:202e7.

<sup>137</sup> Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38:92-9.

<sup>138</sup> Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001;345:494e502. [Erratum published in *N Engl J Med* 2001;345:1506].

<sup>139</sup> Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2005;352:1179e89.

<sup>140</sup> King SB 3rd, Smith SC Jr, Hirshfeld JW Jr, et al. 2007 Focused Update of the ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2008;117:261e95. [Erratum, *Circulation* 2008;117 (6):e161].

<sup>141</sup> Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006;27:647e54.

<sup>142</sup> Bliden KP, Dichiara J, Tantry US, et al. Increased risk in patients with high platelet aggregation receiving chronic clopidogrel therapy undergoing percutaneous coronary intervention: is the current antiplatelet therapy adequate? *J Am Coll Cardiol* 2007;49:657e66.



- <sup>143</sup> Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1505e16.
- <sup>144</sup> Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Paniccia R, Romano E, Gensini GF, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost*. 2008;99:930-5.
- <sup>145</sup> Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, Arikan M, Tellez A, DeLao T, et al. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:743-9.
- <sup>146</sup> Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG, et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation*. 2004;109:166-71.
- <sup>147</sup> Angiolillo DJ, Bernardo E, Ramírez C, Costa MA, Sabaté M, Jiménez-Quevedo P, et al. Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:298-304.
- <sup>148</sup> Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, et al. Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes*. 2005;54:2430-5.
- <sup>149</sup> Capranzano P, Ferreiro JL, Kodlipet D, Alissa R, Darlington A, Charlton RK, et al. Comparative assessment of platelet P2Y12 signaling in type 2 diabetes mellitus versus non diabetic subjects. *Eur Heart J*. 2009;30 Suppl 1:P1309.
- <sup>150</sup> Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Clopidogrel response variability: current status and future directions. *Thromb Haemost*. 2009;102:7-14.
- <sup>151</sup> Soffer D, Moussa I, Harjai KJ, Boura JA, Dixon SR, Grines CL, et al. Impact of angina class on inhibition of platelet aggregation following clopidogrel loading in patients undergoing coronary intervention: do we need more aggressive dosing regimens in unstable angina? *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;59:21-5.
- <sup>152</sup> Sibbing D, Von Beckerath O, Schömig A, Kastrati A, Von Beckerath N. Platelet function in clopidogrel-treated patients with acute coronary syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007;18:335-9.
- <sup>153</sup> Geisler T, Anders N, Paterok M, Langer H, Stellos K, Lindemann S, et al. Platelet response to clopidogrel is attenuated in diabetic patients undergoing coronary stent implantation. *Diabetes Care*. 2007;30:372-4.
- <sup>154</sup> Serebruany V, Pokov I, Kuliczowski W, Chesebro J, Badimon J. Baseline platelet activity and response after clopidogrel in 257 diabetics among 822 patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2008;100:76-82.
- <sup>155</sup> Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Barrera Ramírez C, Sabaté M, Fernandez C, et al. Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J Invasive Cardiol*. 2004;16:169-74.
- <sup>156</sup> 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;100:203-5.

- <sup>157</sup> Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, et al. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation*. 2003;107:32-7.
- <sup>158</sup> Neubauer H, Günesdogan B, Hanefeld C, Spiecker M, Mügge A. Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function —a flow cytometry study. *Eur Heart J*. 2003;24:1744-9.
- <sup>159</sup> Saw J, Steinhubl SR, Berger PB, Kereiakes DJ, Serebruany VL, Brennan D, et al. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation Investigators. Lack of adverse clopidogrel-atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomized, placebo-controlled clopidogrel trial. *Circulation*. 2003;108:921-4.
- <sup>160</sup> Saw J, Brennan DM, Steinhubl SR, Bhatt DL, Mak KH, Fox K, et al. CHARISMA Investigators. Lack of evidence of a clopidogrel-statin interaction in the CHARISMA trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:291-5.
- <sup>161</sup> Lim MJ, Spencer FA, Gore JM, Dabbous OH, Agnelli G, Kline-Rogers EM, et al. GRACE Investigators. Impact of combined pharmacologic treatment with clopidogrel and a statin on outcomes of patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: perspectives from a large multinational registry. *Eur Heart J*. 2005;26:1063-9.
- <sup>162</sup> Angiolillo DJ, Alfonso F. Clopidogrel-statin interaction: myth or reality? *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:296-8.
- <sup>163</sup> Siller-Matula JM, Lang I, Christ G, Jilma B. Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1557-63.
- <sup>164</sup> Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Calcium-channel blockers decrease clopidogrel-mediated platelet inhibition. *Heart*. 2009 Aug 16.
- <sup>165</sup> Li XQ, Andersson TB, Ahlström M, Weidolf L. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos*. 2004;32:821-7.
- <sup>166</sup> Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G, et al. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:256-60.
- <sup>167</sup> Sibbing D, Morath T, Stegherr J, Braun S, Vogt W, Hadamitzky M, et al. Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb Haemost*. 2009;101:714-9.
- <sup>168</sup> Siller-Matula JM, Spiel AO, Lang IM, Kreiner G, Christ G, Jilma B. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J*. 2009;157:148.e1-5.
- <sup>169</sup> Small DS, Farid NA, Payne CD, Weerakkody GJ, Li YG, Brandt JT, et al. Effects of the proton pump inhibitor lansoprazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel. *J Clin Pharmacol*. 2008;48:475-84.
- <sup>170</sup> Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE Jr, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American

College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:e1-157.

<sup>171</sup> Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernández-Avilés F, et al. Guía de Práctica Clínica para el diagnóstico y tratamiento del síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60:1070. e1-80.

<sup>172</sup> Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, et al. 2007 focused update of the ACC/ AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:210-47.

<sup>173</sup> Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Guía de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC). Manejo del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevación persistente del segmento ST. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62:e1-47.

<sup>174</sup> King SB 3rd, Smith SC Jr, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Morrison DA, Williams DO, et al. 2007 focused update of the ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:172-209.

<sup>175</sup> Silber S, Albertsson P, Fernandez-Avilés F, Camici PG, Colombo A, Hamm C, et al. Guías de Práctica Clínica sobre intervencionismo coronario percutáneo. *Rev Esp Cardiol.* 2005;58:679-728.

<sup>176</sup> Faber MS, Fuhr U. Time response of cytochrome P450 1A2 activity on cessation of heavy smoking. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76:178-84.

<sup>177</sup> Bliden KP, Dichiaro J, Lawal L, Singla A, Antonino MJ, Baker BA, et al. The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:531-3.

<sup>178</sup> Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Smoking promotes clopidogrel-mediated platelet inhibition in patients receiving dual antiplatelet therapy. *Thromb Res.* 2009.

<sup>179</sup> Desai NR, Mega JL, Jiang S, Cannon CP, Sabatine MS. Interaction between cigarette smoking and clinical benefit of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:1273-8.

<sup>180</sup> Saraff KY, Steinhubl SR, Hsu AP, Topol EJ. Smoking influences the effectiveness of dual antiplatelet therapy on long-term outcomes following percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:36B.

<sup>181</sup> Yousef AM, Arafat T, Bulatova NR, Al-Zumyly R. Smoking behaviour modulates pharmacokinetics of orally administered clopidogrel. *J Clin Pharm Ther.* 2008;33:439-49.

<sup>182</sup> Marín F, González-Conejero R, Capranzano P, Bass TA, Roldán V, Angiolillo DJ. Pharmacogenetics in cardiovascular antithrombotic therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:1041-57.

<sup>183</sup> Taubert D, Von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80:486-501.

- <sup>184</sup> Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, et al. French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2009;360:363-75.
- <sup>185</sup> Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA*. 2009;302:849-57.
- <sup>186</sup> Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. 2009; 360:354-62.
- <sup>187</sup> Mega JL, Simon T, Collet JP, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA*. 2010; 304:1821-30.
- <sup>188</sup> Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*. 2010; 121:481-3.
- <sup>189</sup> Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med*. 2010; 363:1704-14.
- <sup>190</sup> Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*. 2003;108:989-95.
- <sup>191</sup> Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Cavallari U, Trabetti 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.
- <sup>192</sup> Angiolillo DJ, Fernández Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Cavallari U, Trabetti E, et al. Variability in platelet aggregation following sustained aspirin and clopidogrel treatment in patients with coronary heart disease and influence of the 807C/T polymorphism of the glycoprotein Ia Gene. *Am J Cardiol*. 2005;96:1095-9.
- <sup>193</sup> Cuisset T, Frere C, Quilici J, Morange PE, Saut N, Romero-Barra M, et al. Lack of association between the 807 C/T polymorphism of glycoprotein Ia gene and post-treatment platelet reactivity after aspirin and clopidogrel in patients with acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2007;97:212-7.
- <sup>194</sup> Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Sabaté M, Fernández C, et al. P1A polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15:89-93.
- <sup>195</sup> Lev EI, Patel RT, Guthikonda S, Lopez D, Bray PF, Kleiman NS. Genetic polymorphisms of the platelet receptors P2Y(12), P2Y(1) and GP IIIa and response to aspirin and clopidogrel. *Thromb Res*. 2007;119:355-60.
- <sup>196</sup> Holmes DR Jr, Dehmer GJ, Kauls S, et al. ACCF/AHA Clopidogrel Clinical Alert: Approaches to the FDA "Boxed Warning". *Circulation* 2010;122:537e57.
- <sup>197</sup> Sofi F, Giusti B, Marcucci R, et al. Cytochrome P450 2C19(\*)2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2011;11:199e206. 16. Jin

- 
- B, Ni HC, Shen W, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism is associated with poor clinical outcomes in coronary artery disease patients treated with clopidogrel. *Mol Biol Rep* 2011;38:1697e702.
- <sup>198</sup> Hulot JS, Collet JP, Silvain J, et al. Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C19\*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:134e43. 17.
- <sup>199</sup> Mega JL, Simon T, Collet JP, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI. *JAMA* 2010;304:1821e30.
- <sup>200</sup> Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, et al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet*. 2010; 376:1320-8.
- <sup>201</sup> Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, et al; NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies. Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* 2007;447:655e60.
- <sup>202</sup> Sorich MJ, Rowland A, McKinnon RA, Wiese MD. CYP2C19 genotype has a greater effect on adverse cardiovascular outcomes following percutaneous coronary intervention and in Asian populations treated with clopidogrel: a meta-analysis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7:895-902.
- <sup>203</sup> Collet JP, Hulot JS, Pena A, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 2009;373:309e17.
- <sup>204</sup> Mao L, Jian C, Changzhi L, Dan H, Suihua H, Wenyi T, Wei W. Cytochrome CYP2C19 polymorphism and risk of adverse clinical events in clopidogrel-treated patients: a meta-analysis based on 23,035 subjects. *Arch Cardiovasc Dis*. 2013 Oct;106(10):517-27.