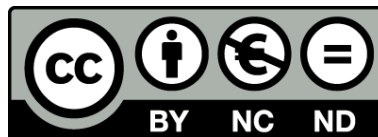




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio farmacoepigénomico de la respuesta al tratamiento secundario en pacientes de ictus isquémico

Cristina Gallego Fàbrega



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Estudio farmacogenómico de la respuesta al
tratamiento secundario en pacientes con ictus
isquémico.**

Cristina Gallego Fàbrega



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartir Igual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**



**UNIVERSITAT DE
BARCELONA**

**ESTUDIO FARMACOEPIGENÓMICO DE LA
RESPUESTA AL TRATAMIENTO SECUNDARIO EN
PACIENTES CON ICTUS ISQUÉMICO**

TESIS PRESENTADA POR

Cristina Gallego Fàbrega

Para obtener el título de doctor por la Universidad de Barcelona

DIRIGIDA POR

Israel Fernández Cadenas y Jerzy Krupinski

Programa de doctorado en Medicina

Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona



**Fundació de
Docència i Recerca
Mútua Terrassa**

Israel Fernández Cadenas Doctor en Biología y **Jerzy Krupinski** Catedrático de la Universidad de Manchester y Doctor en Biología Molecular.

CERTIFICAN:

La presente tesis que lleva por título "**Estudio Farmacoepigenómico de la resistencia al tratamiento secundario en pacientes de ictus isquémico**" presentada por la licenciada Cristina Gallego Fàbrega para obtener el grado de doctor por la Universidad de Barcelona, se ha realizado bajo nuestra supervisión en el *Laboratorio de Epigenómica y Genética Neurovascular* de la Fundació Docència i Recerca, Mutua de Terrassa y cumple todos los requisitos para su tramitación y posterior defensa ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado

Terrassa, 13 Abril 2016

Dr. Israel Fernández Cadenas

Dr. Jerzy Krupinski

It's just a little trick,
but there is a long story connected with it
which it would take too long to tell.

G. MENDEL, in conversations with C.W. EICHLING

Agradecimientos

Una tesis no es, ni nunca será, el trabajo de una única persona. Se necesita mucho más que el esfuerzo individual del doctorando. Se necesita a alguien que te de una oportunidad, a varias personas que te guíen durante el camino y a muchas que te den soporte a diversos niveles. A todos y cada uno de los que habéis formado parte de estos poco más de tres años, a los que ya estabais antes y a los que os quedareis después.

GRACIAS



Tabla de Contenido

Agradecimientos	I
Tabla de contenido	III
Lista de abreviaciones	V
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. GENÉTICA Y EPIGENÉTICA	11
1.1.1. <i>Introducción</i>	11
1.1.2. <i>Mecanismos epigenéticos</i>	13
1.1.3. <i>Estudios genéticos.</i>	15
1.1.4. <i>Estudios epigenéticos.</i>	16
1.2. EL ICTUS	18
1.2.1. <i>Definición</i>	18
1.2.2. <i>Epidemiología</i>	19
1.2.3. <i>Clasificación</i>	19
1.2.4. <i>Factores de riesgo</i>	20
1.2.5. <i>Genética del ictus isquémico y hemorrágico</i>	20
1.2.6. <i>Epigenética en el ictus y en enfermedades cardiovasculares</i>	23
1.3. RECURRENCIA VASCULAR	24
1.3.1. <i>Definición y epidemiología</i>	24
1.3.2. <i>Causas y factores de riesgo.</i>	24
1.3.3. <i>Genética y recurrencia vascular</i>	25
1.4. TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO	25
1.4.1. <i>Acción de los antiplaquetarios</i>	25
1.4.2. <i>Tipos de antiplaquetarios.</i>	26
1.4.3. <i>Aspirina</i>	27
1.4.3.1. <i>Características y Mecanismos de acción</i>	27
1.4.3.2. <i>Administración</i>	28
1.4.3.3. <i>Beneficios</i>	28
1.4.4. <i>Clopidogrel</i>	29
1.4.4.1. <i>Características y Mecanismos de acción</i>	29
1.4.4.2. <i>Administración</i>	29
1.4.4.3. <i>Beneficios</i>	29
1.5. RESISTENCIA AL TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO.	30
1.5.1. <i>Definición de Resistencia</i>	30
1.5.2. <i>Resistencia bioquímica y resistencia clínica</i>	30
1.5.3. <i>Problemática de la resistencia</i>	32

TABLA DE CONTENIDO

1.6.	FARMACOGENÉTICA Y RECURRENCIA VASCULAR	32
1.6.1.	<i>Farmacogenética</i>	32
1.6.2.	<i>Farmacogenética de la Aspirina</i>	33
1.6.2.1.	<i>Estudios de genes candidato</i>	33
1.6.2.2.	<i>Estudios GWAS</i>	34
1.6.2.3.	<i>Problemática no efectividad</i>	34
1.6.3.	<i>Farmacogenética del Clopidogrel</i>	35
1.6.3.1.	<i>Estudios de genes candidato</i>	35
1.6.3.2.	<i>Estudios GWAS</i>	36
1.6.3.3.	<i>Problemática, la no efectividad</i>	36
1.6.3.4.	<i>Controversia FDA</i>	37
2.	HIPÓTESIS	41
3.	OBJETIVOS	45
4.	ARTÍCULOS	49
4.1.	ARTÍCULO 1	49
4.2.	ARTÍCULO 2	80
4.3.	ARTÍCULO 3	81
5.	DISCUSIÓN	105
5.1.	RECURRENCIA VASCULAR Y TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO.	105
5.2.	VALIDEZ DE LOS POOLS DE MUESTRA EN ESTUDIOS BASADOS EN ARRAYS DE METILACIÓN.	106
5.3.	HIPOMETILACIÓN DE TRAF3 Y RESISTENCIA CLÍNICA A CLOPIDOGREL.	107
5.4.	HIPERMETILACIÓN DE PPM1A Y RESISTENCIA CLÍNICA A ASPIRINA.	109
6.	CONCLUSIONES	115
7.	BIBLIOGRAFIA	117
8.	ANEXO	128
8.1.	ARTÍCULO 4	128

Lista de Abreviaciones

3'UTR	Región no traducida 3'
5'UTR	Región no traducida 5'
450k BeadChip	Illumina HumanMethylation450 BeadChip
ACCP	American College of Chest Physicians
ACV	Accidente Cerebrovascular
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosina Difosfato
AHA/ASA	American Heart Association / American Stroke Association
AIT	Ataque Isquémico Transitorio
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNip	Ácido Ribonucleico pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento
ARNnc	Ácido Ribonucleico no codificante
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosómico
ARNsno	Ácido Ribonucleico nucleolar pequeño
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
CCS	Causative Classification of Stroke System
CpG	Dímero Citosina-fosfato-Guanina
CPIC	Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium
CYP	Citocromo P450
DMC	Isla CpG diferencialmente metilada
DNMT	ADN (citosina-5)-metiltransferasa
EWAS	Estudio de Asociación del Epigenoma Completo
FDA	American Food and Drugs Administration
GpIIb/IIIa	Glicoproteína II α /III β
GWAS	Estudio de Asociación del Genoma Completo
IH	Ictus Hemorrágico
IM	Infarto de Miocardio
INVEST-GENES	International Verapamil SR/trandolapril Study GENetic Substudy
lncARN	Ácido Ribonucleico de cadena larga no codificante
LTA	Light Transmission Aggregometry
ME	Metabolizador Extensivo
MI	Metabolizador Intensivo
miARN	Micro Ácido Ribonucleico
MP	Metabolizador Pobre

Lista de Abreviaciones

MU	Metabolizador Ultrarápido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAPI	Pharmacogenomics of Antiplatelet Intervention Study
PEAR1	Receptor Endotelial de la Agregación Plaquetaria 1
Piwi-ARN	Ácido Ribonucleico asociado a Piwi
SiGN	Stroke Genetics Network
SNP	Polimorfismo de Cambio de un Sólo Nucleótido
TOAST	Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
TSS	Transcription Start Site
TXA2	TromboxanoA2
WTCC	Consorcio Wellcome Trust Case Control

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Genética y Epigenética

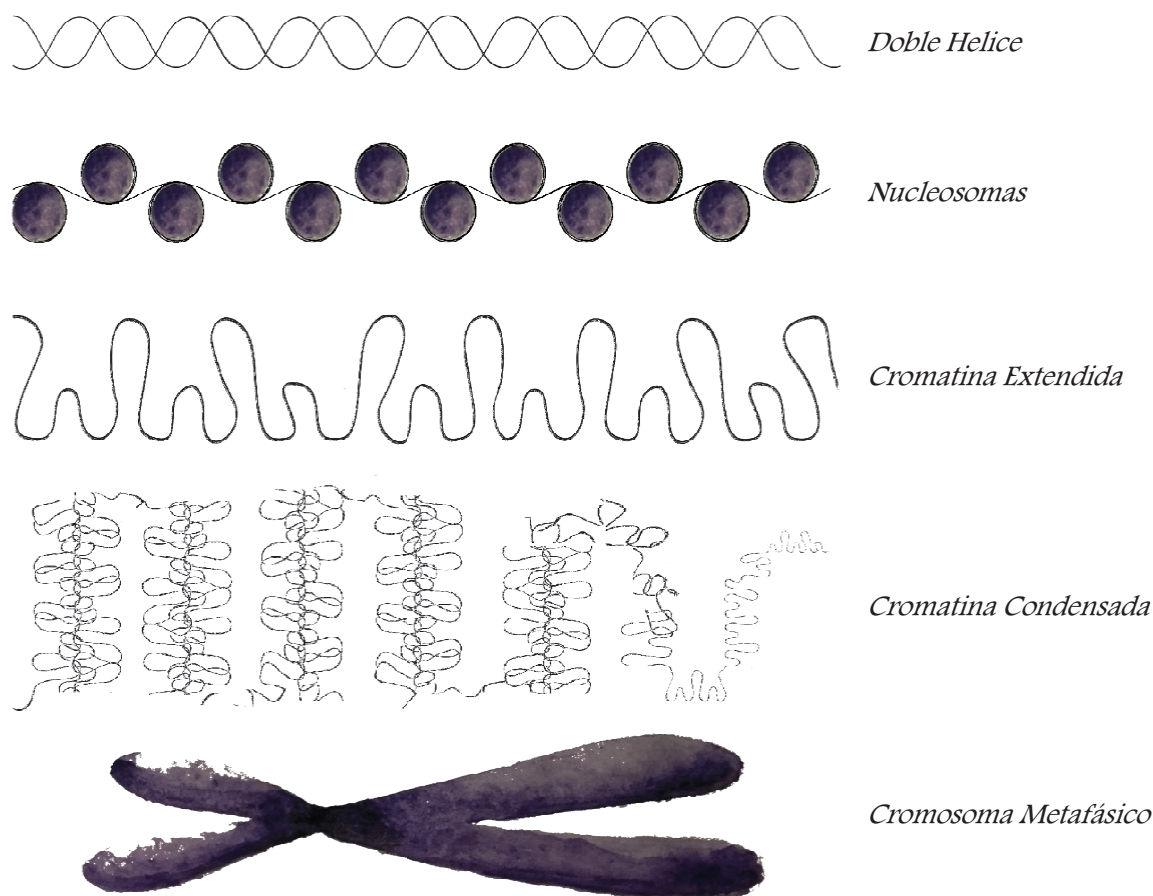
1.1.1. Introducción

El ser humano desde siempre ha sentido curiosidad por los procesos de la herencia, porqué los descendientes comparten trazos con sus progenitores, y cómo estos se transmiten de generación en generación. Los primeros estudios de pedigrí se remontan a la antigua Babilonia, pero no fue hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando los trabajos de Charles Darwin y Gregor Mendel, en los que se introdujo la teoría de la evolución biológica y los fenómenos de la herencia, sentaron las bases para el establecimiento de la genética moderna. A principios del siglo XX William Baeston acuñó el término genética para referirse a "la ciencia dedicada al estudio de los fenómenos de la herencia y de la variación".

En la actualidad, la genética es la rama de la biología encargada de estudiar los genes, la herencia y la variabilidad de los organismos vivos. Esta, trata de comprender la transmisión de la herencia de una generación a la siguiente, incluyendo la estructura molecular y función de los genes, su comportamiento en el contexto de la célula u organismo y la distribución y variantes génicas entre poblaciones. Los genes son secuencias de nucleótidos de longitud variable, que generalmente codifican una proteína la cual llevará a cabo una acción en la célula o su entorno. Los estudios genéticos abarcan un gran número de disciplinas, tales como la bioquímica, la biología celular, la epidemiología y más recientemente la bioinformática.

El ADN se encuentra altamente condensado en el interior de las células. En el primer nivel de empaquetamiento el ADN se asocia a los nucleosomas para dar lugar a la cromatina, que finalmente en un nivel superior de empaquetamiento da lugar a los cromosomas (Figura 1). Esta organización estructural permite un acceso eficaz a la información genética, al crear capas adicionales de control en la regulación de la expresión génica. Cuando la cromatina se encuentra condensada, la secuencia de ADN se encuentra menos accesible a los factores de la transcripción impidiendo la transcripción. Por el contrario, cuando la cromatina está menos compactada el ADN está más expuesto y se promueve la transcripción, en este caso se dice que los genes están activos. El nivel de compactación de la cromatina está influenciado por marcas químicas, modificaciones epigenéticas, a lo largo de la secuencia de ADN o en los nucleosomas (Figura 2). Este sofisticado mecanismo permite que partiendo de un mismo genotipo se puedan observar diferentes fenotipos. Así, del mismo modo que la secuencia de ADN es única a cada individuo, los patrones de metilación son propios de cada tipo celular (Consortium et al. 2015) y estadio del desarrollo (Goldberg, Allis, and Bernstein 2007). El estudio de estas marcas y su relación con los fenotipos ha dado lugar a la aparición de una nueva rama dentro de la genética, la epigenética.

Figura 1: Niveles de empaquetamiento del ADN.



El término epigenética fue acuñado por Conrad H. Waddington en 1942 para describir la interacción de los genes con el ambiente. La epigenética es la encargada de estudiar las modificaciones que afectan a la expresión génica y a la estructura de la cromatina sin causar modificaciones en la secuencia de ADN (Berger et al. 2009). Las modificaciones epigenéticas son alteraciones reversibles, potencialmente heredables que pueden estar reguladas por diversos factores como condiciones fisiológicas y patológicas y por el entorno (Berger et al. 2009; Feinberg and Tycko 2004). Como se ha mencionado anteriormente la epigenética juega un papel principal en la regulación y expresión de los genes y está implicada en numerosos procesos celulares, como el desarrollo y diferenciación celular. Entre otros aspectos, explica los diferentes estadios del desarrollo de un organismo y está directamente relacionado con el envejecimiento (Portela & Esteller 2010; Johnson et al. 2012). La epigenética del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad, incluyen cambios en la cantidad de 5-metilcitosinas, y en general se caracterizan por una hipometilación global del epigenoma, excepto por la hipermetilación específica de promotores concretos (Johnson et al. 2012). Algunos de los cambios

en el metiloma asociados a la edad son comunes mientras que otros son específicos para cada tejido (Day et al. 2013). Los estudios más recientes han identificado que las modificaciones epigenéticas también juegan un papel en el desarrollo de enfermedades monogénicas y complejas (Feinberg 2010; Portela and Esteller 2010).

1.1.2. Mecanismos epigenéticos

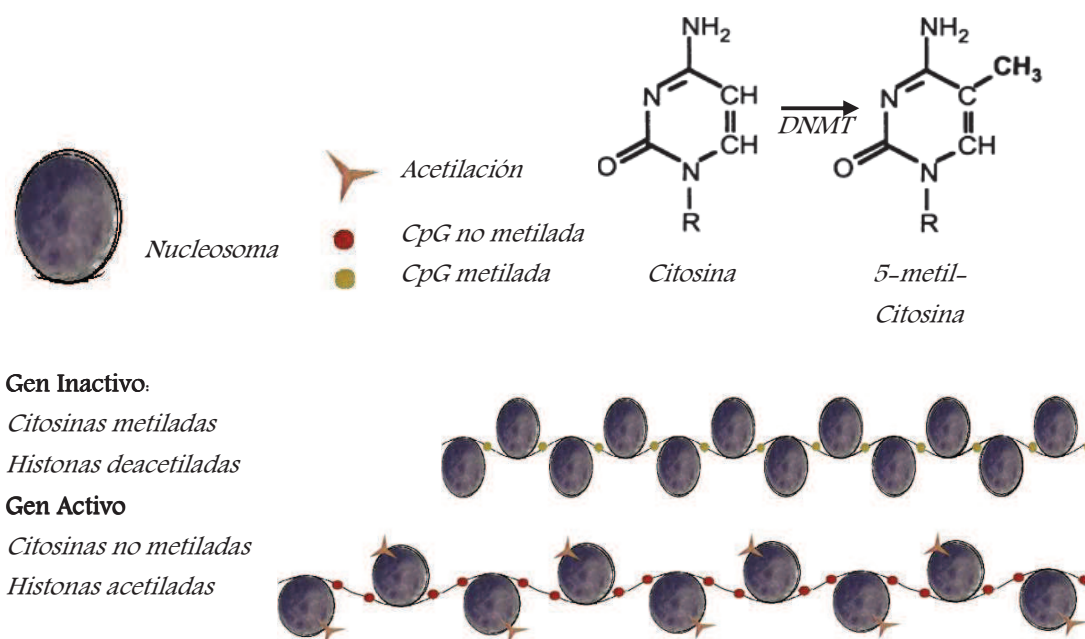
Los principales mecanismo epigenéticos son, la metilación del ADN, la modificación de histonas, el ARN no codificante (ARNnc) y el posicionamiento del nucleosoma (Berger et al. 2009; Portela and Esteller 2010) (Figura 2). Cada una de ellas afecta a la expresión génica de diferente modo.

- ⊗ **ARN no codificante (ARNnc):** Se trata de moléculas de ARN funcionales que no son transcritas a proteína, las cuales actúan como interruptores moleculares regulando la expresión génica. Existen varios tipos de ARNnc de los cuales los más conocidos son los micro ARN (miARN), ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr), pero existen muchos otros: ARNsno, ARNip, Piwi-ARN, lncARN. Estudios recientes indican que pueden existir miles de ARNnc, muchos de los cuales aún no se ha averiguado cual es su función concreta (Palazzo and Lee 2015; Washietl et al. 2007).
- ⊗ **Posicionamiento del nucleosoma:** El nucleosoma es la unidad básica de empaquetamiento del ADN en las células eucariotas y como tal afecta a todos los pasos de la transcripción. El posicionamiento de los nucleosomas en zonas concretas de las regiones de inicio transcripcional (TSSs) juega un papel importante en la iniciación de la transcripción, entre otros, se ha relacionado con cambios en la actividad de la ARN polimerasa II. Por otra parte, la activación de los genes, está estrechamente relacionada con la pérdida de un nucleosoma en el TSS, mientras que su obstrucción se asocia con la represión de los genes. También se ha observado que el posicionamiento de los nucleosomas afecta a la configuración del mapa de metilación (Portela and Esteller 2010; Radman-Livaja and Rando 2010).
- ⊗ **Modificación de histonas:** Las histonas tienen un papel fundamental en la epigenética. Existen una gran variedad de modificaciones postraduccionales en las histonas, la mayoría de ellas ocurren en las colas aminotermiales. Las principales modificaciones de histonas son: acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y ADP-ribosilación, aunque no se limita sólo a estas. Estas modificaciones tienen un papel importante en la regulación de la transcripción, la reparación y la replicación del ADN, el *splicing* alternativo y la condensación de los cromosomas (Bannister and Kouzarides 2011; Portela and Esteller 2010).

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes han observado que las modificaciones de histonas pueden predecir los niveles de expresión génica. La eucromatina, regiones de la cromatina que se encuentran menos compactadas y por tanto activamente transcritas, están caracterizadas por niveles elevados de acetilación y trimetilación. Por el contrario, en la heterocromatina, regiones mucho más compactadas, la transcripción se encuentra inactiva y se han observado niveles más bajos de acetilación (Portela and Esteller 2010).

Figura 2: Mecanismos epigenéticos y niveles de compactación de la cromatina.



- **Metilación del ADN:** La modificación epigenética más estudiada en humanos es la metilación del ADN, esta sucede casi de forma exclusiva en las citosinas cuando forman dímeros con guaninas (CpG). Los dímeros CpG suelen agruparse en regiones de más de 200 bases con un contenido mayor al 60% de C+G, llamadas islas CpG. Existen varios mecanismos mediante los que la metilación del ADN inhibe la expresión de los genes, generalmente relacionados con la reclutación o inhibición de la captación de proteínas que se unen al ADN. Habitualmente, la metilación de las islas CpG se asocia con el silenciamiento de los genes, y tiene un papel principal en la impronta genética y en la inactivación del cromosoma X (Portela and Esteller 2010).

Las enzimas ADN (citosina-5) metiltransferasa (DNMT) son las encargadas de catalizar la transferencia del grupo metil (-CH₃) desde S-adenosil metionina al ADN. Se conocen cinco miembros de esta familia de enzimas, de los cuales sólo tres (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) tienen actividad metiltransferasa. DNMT3a y DNMT3b se clasifican como de

novo DNMTs y son las encargadas de establecer el patrón de metilación durante el desarrollo embrionario. Estas enzimas están sobre expresadas en células madre embrionarias en comparación con las células diferenciadas. DNMT1 es una DNMT de mantenimiento y se encarga de la metilación de las islas CpG durante la replicación del ADN (Portela and Esteller 2010).

1.1.3. Estudios genéticos.

En el campo de la medicina los estudios genéticos, entre otros, buscan las causas de las enfermedades con componente genético, cómo se transmiten, su diagnóstico y eventualmente su tratamiento. Gran parte de estos estudios se basan en identificar alteraciones en la secuencia de ADN y su relación con las enfermedades. Los estudios de asociación son las herramientas más importantes para la identificación de alteraciones en genes que confieren susceptibilidad a patologías. De este modo se han identificado genes asociados tanto a enfermedades monogénicas, aquellas causadas por mutaciones en un único gen (mutaciones de baja frecuencia pero con un gran efecto) como enfermedades complejas, en las que intervienen mutaciones en varios genes (mutaciones de alta frecuencia pero pequeño efecto).

Los estudios de asociación tratan de identificar la relación entre las alteraciones genéticas y la aparición de enfermedades para identificar genes candidatos y regiones del genoma que contribuyen a una enfermedad específica. Una mayor frecuencia de un polimorfismo de cambio de un sólo nucleótido (SNP), en un conjunto de individuos afectados por una misma enfermedad, puede ser interpretado como que dicha variante aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad, o que existe otra mutación ligada a este polimorfismo que confiere una mayor susceptibilidad a desarrollar la patología. Aunque los SNPs no son los únicos marcadores genéticos utilizados en los estudios de asociación, sí son los más comúnmente utilizados.

Mediante estudios de genes candidato se han identificado numerosos polimorfismos asociados con una gran variedad de enfermedades (Lohmueller et al. 2003) no obstante, las variantes genéticas de riesgo encontradas a través de esta estrategia muy frecuentemente no son posibles de replicar en subsiguientes estudios. Este tipo de estudios seleccionan uno o un grupo reducido de genes, de los que se tiene sospecha (o conocimiento previo) de su posible relación con la enfermedad. Consecuentemente, se tratan de estudios sesgados y, además, habitualmente realizados en cohortes de pequeño tamaño muestral.

En los últimos años, y gracias a los avances tecnológicos es posible realizar estudios no sesgados en los que se analiza todo el genoma de un individuo. Mediante los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) se están identificando nuevos polimorfismos en genes

INTRODUCCIÓN

de los que anteriormente no se sospechaba ninguna relación con la enfermedad de estudio. Estas asociaciones han sido validadas en estudios posteriores independientes ,por ejemplo, los miembros del Consorcio *Wellcome Trust Case Control Consortium* (WTCC) identificaron, mediante GWAS, un total de 24 asociaciones significativas en genes no descritos anteriormente (1 en trastorno bipolar, 1 en enfermedad coronaria, 9 en enfermedad de Crohn, 3 artritis reumatoide, 7 en diabetes tipo 1 y 3 en diabetes tipo 2) (Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) 2007). El estudio se realizó en una cohorte de 3.000 controles y 14.000 afectados de 7 enfermedades complejas diferentes.

A pesar del éxito de los GWAS, dado que en muchos casos los polimorfismos contribuyen a la enfermedad con efectos muy pequeños (bajas *Odd Ratios*), son necesarios grandes tamaños muestrales para identificar resultados significativos con un poder estadístico adecuado. Esto conlleva un incremento en el coste de los estudios. Pearson JV et al. desarrollaron y validaron una serie de métodos, diseños experimentales y análisis para realizar GWAS usando *pools* de muestras (Pearson et al. 2007). En estos estudios, se agrupan en una misma muestra (*Pool*) el ADN de diferentes individuos, lo que permite analizar un mayor número de sujetos a un coste más reducido, obteniendo resultados similares a los conseguidos mediante análisis individuales (Gaj et al. 2012; Pearson et al. 2007; Sham et al. 2002). A pesar de sus ventajas, los estudios con *pools* tienen varios inconvenientes que deben ser considerados en el diseño experimental. Los *pools* de ADN se deben realizar asegurándose de que cada muestra individual aporte la misma cantidad de ADN a la mezcla. Al diseñar el *pool* hay que tener en cuenta posibles estratificaciones de la población, y variables e interacciones que pudieran influenciar los resultados (Sham et al. 2002). Es importante que en el análisis estadístico se tengan en cuenta posibles errores en estos y otros pasos. Hasta la fecha este tipo de aproximación únicamente se ha realizado en estudios GWAS, pero no en la identificación de alteraciones epigenéticas usando arrays de metilación.

1.1.4. Estudios epigenéticos.

La publicación de la primera secuencia del genoma humano a principios del 2003, es considerado uno de los hitos más importantes en la investigación biológica moderna. El Proyecto Genoma Humano reportó información detallada sobre la estructura, organización y función del genoma, a la vez que permitió grandes avances tecnológicos en el estudio de la genómica (International Human Genome Sequencing Consortium. 2004). Este estudio cartografió y secuenció aproximadamente el 99 por ciento de las regiones que contienen genes del genoma humano, estimando la existencia de 20.000 genes. La información y los avances tecnológicos generados por este proyecto, han permitido desarrollar un mapa de los haplotipos "*HapMap*" del genoma humano. HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) es una de las herramientas más

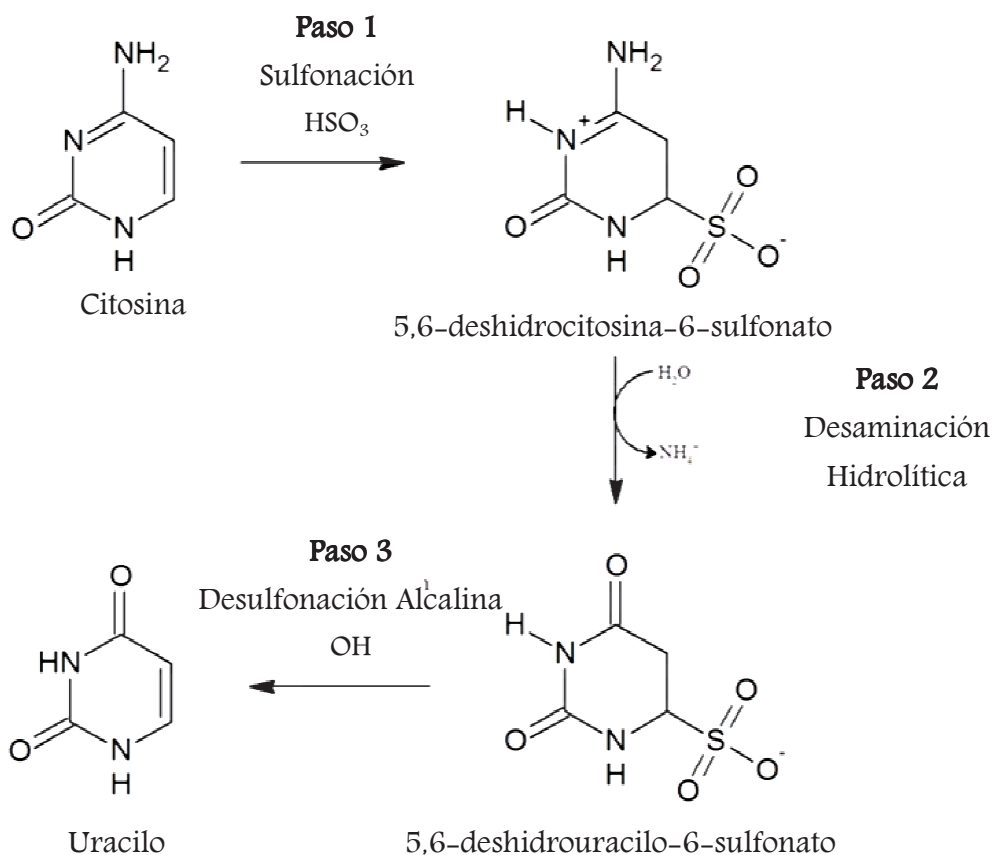
importantes en los estudios genéticos, al permitir estudiar la totalidad de un genoma a partir de un número reducido de SNPs.

A pesar de lo revolucionario del Proyecto Genoma Humano y su impacto en el entendimiento actual sobre la genética y su influencia en los fenotipos, Beck et al. en su carta "*From genomics to epigenomics: a loftier view of life*" (Nature Biotechnology, 1999) ya sugirió (incluso antes de la finalización del proyecto), que la genética por sí sola no podría responder todas las preguntas que los investigadores se habían planteado (Beck, Olek, and Walter 1999). De este modo crearon el Consorcio del Epigenoma Humano que, bajo el *Roadmap Epigenomics Program*, en febrero de 2015 publicó 111 epigenomas humanos de referencia (Consortium et al. 2015).

La epigenética pese a ser una ciencia todavía emergente, está teniendo un crecimiento muy rápido, en el que cada vez hay más evidencias de la influencia que esta tiene en el desarrollo de enfermedades (Feinberg 2010). Un ejemplo clásico entre epigenética y patología es el síndrome de Rett, en el que mutaciones en el gen *MECP2* ligado al cromosoma X, que codifica la proteína methyl-CpG-bindingprotein2, se une de forma selectiva a los dinucleótidos CpG actuando como represor de la transcripción (Amir et al. 1999).

Siguiendo la tendencia marcada por la genómica, en los últimos años se han popularizado los estudios epigenómicos, en los que se examina todo el epigenoma mediante una aproximación libre de hipótesis. Los estudios más extendidos son de asociación del epigenoma completo (EWAS), en los que se utilizan arrays de metilación. Entre ellos, la plataforma más utilizada es el Illumina HumanMethylation450 BeadChip (450k BeadChip) (Bock 2012), en el que se analiza el grado de metilación en más ≈ 480.000 islas CpG a lo largo del genoma, con una resolución de un solo nucleótido y hasta 12 muestras simultáneas (Bibikova et al. 2011). Este array presenta una media de 17 CpGs por gen, distribuidas a lo largo del promotor, extremo 5'UTR, primer exón, cuerpo del gen y extremos 3'UTR. El paso inicial en el análisis de metilación es la conversión de bisulfito de las muestras, que permitirá posteriormente identificar las citosinas metiladas (Figura 3). Posteriormente se realiza una amplificación a nivel genómico y una fragmentación enzimática. Finalmente después de la hibridación de los fragmentos, se realiza la extensión nucleótido a nucleótido, el marcado y la detección de las sondas (Bibikova et al. 2011).

Figura 3: Conversión de Bisulfito.



Secuencia de ADN Original

Secuencia de ADN tras conversión de bisulfito

GTTGC^mGTCATCGTGCC
GTTGUGTCATCGTGCC

Los estudios epigenómicos han obtenidos resultados interesantes en patologías como el cáncer (Feinberg and Tycko 2004; Verma 2012), enfermedades psiquiátricas (Ikegame et al. 2013), diabetes mellitus (Soriano-Tárraga et al. 2015), obesidad (Xu et al. 2013), arterioesclerosis (Zaina et al. 2014), o colitis ulcerosa (Häsler et al. 2012). También se han identificado una fuerte relación con la edad (Johnson et al. 2012), el consumo de tabaco (Shenker et al. 2013) o la dieta (Paul et al. 2015).

1.2. El ictus

1.2.1. Definición

El ictus o enfermedad cerebrovascular es un trastorno circulatorio cerebral de aparición súbita debido a la interrupción del flujo sanguíneo en el cerebro. Dicha interrupción puede ser transitoria o permanente y estar causada por la oclusión o ruptura de un vaso sanguíneo, que conlleva una disminución del aporte de oxígeno y nutrientes en la zona del cerebro afectada. El

daño cerebral aunque inmediato, puede variar en gravedad dependiendo del tipo de ictus, la rapidez con que se diagnostica y se trata y la propia evolución del paciente.

1.2.2. Epidemiología

Pese a los avances en la prevención, diagnóstico y tratamiento, el ictus representa la segunda causa de mortalidad en el mundo y la primera causa de discapacidad en el adulto en los países desarrollados, con una incidencia media de 200 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año (Thorvaldsen et al. 1995; Truelsen et al. 2006). Aunque esta tasa puede variar considerablemente según el área geográfica (Heuschmann et al. 2009). En Estados Unidos se producen ≈ 795.000 casos de ictus cada año, de los cuales 610.000 son nuevos eventos y 185.000 son ictus recurrentes (Mozaffarian et al. 2015). En nuestro país, sigue siendo la principal causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres, con una incidencia de 185 casos por cada 100.000 habitantes (Díaz-Guzmán et al. 2012). Con una incidencia del 7,5% en la población mayor de 65 años (Medrano Alberto et al. 2006) y considerando un envejecimiento progresivo de la sociedad, el ictus supone un problema de gran impacto sociosanitario, con una alta repercusión económica, y un coste estimado de 27 billones de euros anuales únicamente en Europa (Di Carlo 2009).

1.2.3. Clasificación

El ictus puede clasificarse en dos subtipos, según se mantenga o no la integridad del vaso sanguíneo (Figura 4). El ictus hemorrágico está causado por la rotura de un vaso, provocando derrame del contenido sanguíneo, siendo aproximadamente el 15% del total de casos de ictus. Por otro lado, la interrupción del flujo sanguíneo debido a la obstrucción de una arteria da lugar a un ictus isquémico, los cuales representan entre el 80-85% de los accidentes cerebro vasculares. Ambas situaciones conllevan una disminución del aporte de oxígeno y nutrientes al parénquima cerebral (Lloyd-Jones et al. 2009).

Existen varias subclasificaciones para el ictus isquémico según si atendemos a su presentación clínica o a su etiología. Una de las clasificaciones etiológicas más extendida es el '*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment*' (TOAST) (Adams et al. 1993), en el que se divide los ictus entre: aterotrombóticos, cardiembólicos, lacunares, criptogénicos y otras causas (Tabla 1). Más recientemente se ha introducido la escala '*Causative Classification of Stroke System*' (CCS) en el que mediante un algoritmo computerizado se indica cual es el mecanismo causal del ictus más probable, basándose en los 5 subtipos designados por la clasificación TOAST (Arsava et al. 2010).

INTRODUCCIÓN

Identificar la etiología es de gran importancia para el pronóstico de la enfermedad y sobre todo para su prevención secundaria. Estudios previos han demostrado que los ictus aterotrombóticos se asocian con un riesgo elevado de recurrencia dentro de los primeros 30 días (OR = 2,9), en cambio dicha asociación es menor en los pacientes cardioembólicos (OR = 1) y lacunares (OR = 0,2) (Lovett, Coull, and Rothwell 2004).

Tabla 1: Clasificación etiológica de los Ictus según TOAST.

Clasificación	Etiología	Clínica
Aterotrombóticos	Arteriosclerosis de vaso grande	Presencia de >50% de estenosis o oclusión en una arteria principal o una rama cortical.
Cardioembólicos	Infarto cardioembólico	Oclusiones arteriales causadas por un émbolo producido o desprendido de una cavidad del corazón.
Lacunares	Oclusión de pequeño vaso	Presencia de alguno de los síntomas típicos de los infartos lacunares sin evidencia de disfunción cerebrocortical.
Otros	Ictus de otra etiología	Presentar causas infrecuentes de ictus como vasculopatías no ateroscleróticas, estados hipercoagulativos o enfermedades hematológicas.
Criptogenéticos	Ictus de etiología criptogenética o indeterminada	* Presenta más de una causa de ictus. * Evaluación negativa a pesar de estudio completo. * Estudio incompleto

Fuente: Adams, H.P et al.(Adams et al. 1993)

1.2.4. Factores de riesgo

Los factores de riesgo descritos para ictus son comunes a los de otras enfermedades vasculares (tabla 2) y se pueden clasificar entre modificables y no modificables. De entre los factores no modificables, la edad y el género son los más conocidos. Se ha observado que la incidencia de ictus es casi el doble en varones que en mujeres y que el riesgo de ictus se duplica cada década a partir de los 55 años y se triplica a partir de los 80 (Sacco et al. 1994). Entre los factores de riesgo modificables, el más frecuente es la hipertensión arterial (HTA), junto con fibrilación auricular, diabetes y tabaquismo (Meschia et al. 2014).

1.2.5. Genética del ictus isquémico y hemorrágico

La influencia de la genética en el riesgo de sufrir un ictus es uno de los principales factores de riesgo individual, tanto en los tipos comunes de ictus como en los poco frecuentes o familiares (Meschia et al. 2014). Se ha observado que presentar historia familiar de ictus incrementa en un 30-37% el riesgo de padecer un ictus (Bevan et al. 2012; Flossmann, Schulz, and Rothwell 2004), aunque esta heredabilidad puede variar según la edad, el sexo o el subtipo de

ictus (Schulz, Flossmann, and Rothwell 2004; Touzé and Rothwell 2008). Por etiología isquémica, se ha observado una mayor heredabilidad en Aterotrombóticos (40,2%), respecto a cardioembólicos (32,6%) y lacunares (16,1%) (Bevan et al. 2012).

Tabla 2: Factores de riesgo de enfermedad cerebrovascular.

Factores de riesgo no modificables	Factores de riesgo modificables. Bien documentadas	Factores de riesgo modificables. Menos documentadas
Edad	Fibrilación Auricular	Migraña
Sexo	Hipertensión	Síndrome metabólico
Factores genéticos	Diabetes Mellitus	Enolismo
Raza / Etnia	Dislipemia	Consumo de drogas
Bajo peso al nacer	Inactividad física	Apnea del sueño
	Tabaquismo	Hiperhomocisteinemia
	Dieta y Nutrición	Niveles altos de Lipoproteína(a)
	Obesidad y distribución de la grasa corporal	Hipercoagulabilidad
	Otras patologías cardíacas previas:	Antiplaquetarios para la prevención primaria del Ictus
	* Infarto de miocardio agudo	
	* Cardiomiopatía	
	* Enfermedad cardíaca valvular	
	* Fosa Oval Permeable (FOP) y aneurisma septal auricular (ASA).	
	* Tumores cardíacos	
	* Arterioesclerosis cardíaca asintomática	
	* Anemia Falciforme	
		Inflamación e infecciones

Fuente: Meschia JF.(Meschia et al. 2014)

Recientemente el grupo de trabajo METASTROKE publicó un trabajo en el que se meta-analizaron 12 GWAS, con el objetivo de identificar la influencia de variantes genéticas comunes y de baja frecuencia en el riesgo de sufrir ictus isquémico y sus subtipos etiológicos. Se analizaron un total 10.307 ictus isquémicos y 19.326 controles en la fase de descubrimiento y los resultados más significativos ($p < 10^{-05}$) se replicaron en una nueva cohorte compuesta por 13.435 casos y 29.269 controles de origen europeo y 2.385 casos y 5.193 controles de origen asiático (Malik et al. 2016). En este estudio se replicaron asociaciones descritas previamente entre *ABO* (Williams et al. 2013) y el riesgo de ictus isquémico; los genes *PITX2* y *ZFHX3* y el ictus de tipo cardioembólico (Bellenguez et al. 2012; Traylor et al. 2012); y *HDAC9* con el ictus aterotrombótico (Bellenguez et al. 2012; Markus et al. 2013; Traylor et al. 2012). También se observó un enriquecimiento significativo de variantes poco frecuentes (frecuencia alélica $< 5\%$) tanto en los subtipos aterotrombóticos y lacunares, y un enriquecimiento de variantes más frecuentes (frecuencia alélica

INTRODUCCIÓN

10%-30%) en el subtipo cardioembólico, sugiriendo que los factores de riesgo genético que todavía no se han encontrado en el ictus podrían ser variantes raras o de baja frecuencia (Malik et al. 2016).

Estos resultados confirman los resultados obtenidos en el estudio METASTROKE original (Traylor et al. 2012) y por el '*Stroke Genetics Network*' (SiGN) (NINDS Stroke Genetics Network (SiGN) 2015), sugiriendo que los factores de riesgo y desencadenantes genéticos son independientes para cada subtipo de ictus. Este hecho supone la primera prueba experimental de la hipótesis sugerida por algunos autores de que cada subtipo de ictus es en realidad una patología diferente. El primer estudio del METASTROKE se realizó en un total de 12.389 pacientes con ictus isquémico y 62.004 controles, procedentes de 15 cohortes y todos ellos de origen europeo, los resultados más significativos fueron validados en un nuevo conjunto de 13.374 casos y 29.083 controles. Así mismo el estudio SiGN analizó 16.851 pacientes con ictus isquémico y 32.473 controles, y sus resultados fueron replicados *in-silico* en 20.941 casos y 364.736 controles.

En el estudio SiGN también se identificó un nuevo locus (1p13.2) cerca de *TSPAN2* asociado con ictus aterotrombótico y se observó el locus 12q24 cerca de *ALDH2* por primera vez asociado de forma específica a ictus de tipo lacunar. En este estudio también se confirmaron las asociaciones identificadas previamente de *PITX2*, *ZFHX3* con ictus cardioembólico y *HDAC9* con ictus aterotrombótico. Otros estudios, han identificado variantes en los genes *CDKN2A* y *CDKN2B* (previamente relacionados con infarto de miocardio), asociadas con ictus de tipo aterotrombótico (Helgadottir et al. 2007; McPherson et al. 2007), los cuales no se han replicado de forma consistente.

Otros estudios GWAs han identificado dos genes asociados con el riesgo de ictus hemorrágico (IH). Dos variantes en *APOE* son los candidatos más probables en el aumento del riesgo de IH. Un estudio GWAS en 2010 (con 2.189 ictus hemorrágicos y 4.041 controles) asoció los alelos *APOE**ε2 ($p = 6,6 \times 10^{-10}$, OR = 1,82) y *APOE**ε4 ($p = 2,4 \times 10^{-11}$, OR = 2,20) con un mayor riesgo de IH lobar (Biffi et al. 2010). Woo et al. en un reciente estudio GWAS en el que se meta-analizaron seis cohortes diferentes (1.545 casos y 1.481 controles), identificaron un locus en la región cromosómica 12q21.1 con susceptibilidad para ictus hemorrágico lobar ($p = 7,0 \times 10^{-08}$, OR = 1,56) y otro locus en *PMF1* con susceptibilidad para el ictus hemorrágico no lobar ($p = 1,63 \times 10^{-08}$, OR = 1,44) (Woo et al. 2014), estos resultados fueron validados en una cohorte de replicación constituida por 1.681 casos y 2.261 controles. Estudios en cohortes más amplias y poblaciones más diversas son necesarios para aclarar el papel de estas variaciones genéticas en la patogénesis del IH.

Queda patente, que para realizar estudios de asociación a nivel genómico en una enfermedad compleja y con diversas etiologías como es el caso del ictus, son necesarios estudios con grandes tamaños muestrales y fenotipos muy bien definidos. Tal como se ha sugerido por Malik et al. la falta de heredabilidad que se observa, puede estar causada por variantes de baja frecuencia, o incluso alteraciones de tipo epigenético (Malik et al. 2016).

1.2.6. Epigenética en el ictus y en enfermedades cardiovasculares

Hasta la fecha son pocos los estudios que han evaluado la influencia de las alteraciones epigenéticas y el riesgo de ictus u otras enfermedades cardiovasculares. Se han observado relaciones entre la metilación del ADN, la modificación de histonas y los ARN no codificantes y el desarrollo de arterosclerosis, hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca (Voelker-Mahlknecht 2016). Kim et al. estudiaron los niveles de metilación del promotor de *BDNF* ('Brain derived neurotrophic factor'), en más de 200 pacientes con ictus (en el momento de admisión, dos semana después del ictus y tras un año), con el objetivo de evaluar los niveles de metilación de *BDNF* en las fases aguda y crónica de la patología. Se identificaron niveles más elevados de metilación en la región promotora de *BDNF*, en aquellos pacientes con peor recuperación, un empeoramiento de la función cognitiva y un mayor grado de discapacidad física (Kim et al. 2012).

Recientemente Zaina et al. identificó patrones de metilación específicos de arterioesclerosis. Inicialmente secuenciaron y analizaron los niveles de metilación de 93 muestras de aorta con lesión arterioesclerótica, apareadas con 93 muestras de la región sana de la aorta del mismo paciente, y observaron una hipermetilación global en las lesiones arterioescleróticas en comparación con las muestras sanas. En una segunda fase del estudio, se realizó un EWAS en una cohorte mayor, en el que además de identificarse 1.895 islas CpG metiladas diferencialmente (DMC) ($p < 10^{-07}$), observaron una relación entre los niveles de metilación de algunos de estos genes con los niveles de expresión en las lesiones arterioescleróticas (Zaina et al. 2014). En esta misma línea, Zaina et al. en otro EWAS realizado en placas carotídeas de pacientes con eventos vasculares, observaron que cambios pequeños en el metiloma tienen la capacidad de diferenciar las placas aterotrombóticas sintomáticas de las placas asintomáticas (Zaina et al. 2015).

Otros estudios han evaluado la relación entre mecanismos epigenéticos y algunos factores de riesgo cardiovascular. Soriano et al. identificaron una isla CpG localizada en *TXNIP* asociada con diabetes tipo 2 ($p = 1,17 \times 10^{-12}$), que a su vez estaba inversamente relacionada con los niveles de hiperglucemia ($HbA1c \geq 7\%$, $p = 7,3 \times 10^{-16}$) (Soriano-Tárraga et al. 2015). El estudio se realizó mediante EWAS en una cohorte de 355 pacientes con ictus, y posteriormente replicaron los resultados en dos nuevas cohortes de $n = 167$ y $n = 645$ pacientes con ictus. También se ha

INTRODUCCIÓN

reportado una relación entre el riesgo de ictus isquémico en pacientes con obesidad, y los niveles de metilación de la región promotora de *KCNQ1* (Gomez-Uriz et al. 2015). En este mismo estudio se observó una asociación entre los niveles de metilación de *CALD1* y *PM20D1* (no replicado en la cohorte de validación) con el riesgo de ictus isquémico.

Estos estudios, aunque todavía preliminares, dejan entrever una relación entre las modificaciones epigenéticas y las patologías cardiovasculares. Más estudios en este área son necesarios, para entender la compleja relación entre la regulación epigenética y el desarrollo de ictus u otras enfermedades cardiovasculares y su evolución. Además, las modificaciones epigenéticas en contraste con las alteraciones genéticas, al ser reversibles proporcionan potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de la arterioesclerosis u otros factores de riesgo cardiovascular.

1.3. Recurrencia vascular

1.3.1. Definición y epidemiología

Los pacientes con accidente cerebrovascular (ACV) presentan un elevado riesgo de desarrollar nuevos eventos vasculares (recurrencia vascular) ya sea un nuevo ictus, infarto de miocardio o muerte por causa vascular. El riesgo de sufrir un nuevo ACV es especialmente elevado durante el primer año, 10-13% de los casos (15 veces más que la población general). Este riesgo permanecen elevado en los subsiguientes años, 30% de recurrencia a los 5 años (9 veces más que la población general) (Burn et al. 1994). Un estudio realizado en 1.626 pacientes en el 'South London Stroke Register' evidenció un riesgo acumulativo de recurrencia vascular tras sufrir un primer ictus del 8.0% el primer año, 14.1% tras tres años y 16.6% a los cinco años (Hillen et al. 2003). Otros estudios describen un riesgo de 6-8% durante el primer año, 24% a los 5 años y de hasta el 44% tras 10 años (Van Wijk et al. 2005).

1.3.2. Causas y factores de riesgo.

Una vez que aparece un ictus el efecto patogénico de los factores de riesgo persiste y por tanto la posibilidad de recurrencia. Varios de los factores de riesgo asociados al ictus también se han relacionado con el riesgo de recurrencia vascular, especialmente la hipertensión, diabetes mellitus, apnea del sueño, edad y enfermedades cardíacas (Serena et al. 2015; Van Wijk et al. 2005). El proyecto '*Oxford shire Community Stroke*' observó un aumento significativo del riesgo de recurrencia de ACV entre los fumadores (Burn et al. 1994). Asimismo se ha descrito un incremento significativo entre los pacientes con un consumo excesivo de alcohol (Sacco et al. 1994).

1.3.3. Genética y recurrencia vascular

El componente genético de cada individuo puede, junto con el resto de factores de riesgo, estar jugando un papel en la diferencia interindividual observada en la recurrencia vascular. Hasta la fecha pocos estudios han evaluado esta hipótesis, y los que lo han hecho han analizado un número muy reducido de polimorfismos en tamaños muestrales pequeños. Hsieh et al. en un estudio de genes candidato, identificaron dos polimorfismos en el cromosoma 12p13 como predictores independientes de la mortalidad por ictus e ictus recurrentes, en población taiwanesa (n = 765 casos de ACV isquémico) (Hsieh et al. 2012), posteriormente se observaron los mismos resultados en población china (Zhang et al. 2014). Williams et al., realizaron un GWAS para estudiar la relación entre factores genéticos, niveles de biomarcadores de ictus isquémico y riesgo de ictus isquémico. En el estudio observaron un SNP en el gen *CRP* asociado con los niveles de proteína C-reactiva (rs2592902, $p = 1,14 \times 10^{-09}$), que a su vez se asociaba con el riesgo de ictus isquémico nuevo y recurrente (Williams et al. 2016).

Al pesar de los esfuerzos invertidos en incluir variables clínicas para crear modelos de predicción de recurrencia vascular después de un ictus '*Essen Stroke Risk Score*' (Weimar et al. 2008) y '*Stroke Prognosis Instrument*' (Kernan et al. 2000), el poder de predicción de estos modelos es limitado y todavía no son de utilidad en la práctica clínica. Teniendo en cuenta esta limitación, el estudio GRECOS (no publicado) ha tenido como objetivo identificar variantes genéticas asociadas con recurrencia vascular, que puedan ser de utilidad en nuevos modelos de predicción clínico-genéticos. Para ello se han estudiado 256 SNPs, localizados en 115 genes, en un total de 4.482 pacientes con ictus isquémico o AIT. Se ha identificado una variante genética en *MGP*, gen relacionado con la calcificación arterial, asociado con el riesgo de sufrir un nuevo ictus isquémico durante el primer año de seguimiento. Estos resultados son un primer paso en la creación de nuevos modelos de predicción que permitan individualizar las estrategias de prevención secundaria tras un primer ictus.

1.4. Tratamiento antiplaquetario

1.4.1. Acción de los antiplaquetarios

Los fármacos antiplaquetarios son aquellos destinados a prevenir y/o revertir la agregación plaquetaria en la trombosis arterial y son el principal tratamiento en la prevención secundaria en pacientes con ictus isquémico e infarto de miocardio, con el objetivo de evitar la recurrencia vascular (Adams et al. 2008). Una excepción son los ictus cardioembólicos que son tratados con fármacos anticoagulantes, siempre que no presenten riesgo de hemorragias.

INTRODUCCIÓN

La coagulación sanguínea es un proceso esencial del organismo en la respuesta a lesiones tisulares, con el objetivo de evitar la pérdida de sangre. Sin embargo, en la placa arterioesclerótica, la coagulación puede tener consecuencias dañinas como accidentes cardiovasculares. Debido al papel crítico que tienen las plaquetas en el proceso de coagulación, las terapias dirigidas contra la acción de las plaquetas son algunas de las más importantes en el tratamiento contra las enfermedades vasculares.

El beneficio del tratamiento antiplaquetario está bien descrito, se han estudiado un amplio espectro de condiciones clínicas y se ha observado que puede reducir el riesgo de nuevos eventos cardiovasculares en aproximadamente un 25% de los pacientes (Tendera and Wojakowski 2003). A pesar de ello, también se han descrito complicaciones como un mayor riesgo de sangrado o una alta variabilidad en la respuesta a los fármacos, que han de tenerse en consideración durante el tratamiento.

Tipo anti-plaquetario	Subtipo	Función	Fármacos
Inhibidores Enzimáticos	Inhibidores de la ciclooxigenasa	Inhibición la síntesis del tromboxanoA2 (TXA2). El TXA2, producido por las plaquetas, determina un aumento del calcio citoplasmático que contribuye al proceso de activación plaquetaria.	Aspirina Sulfinpirazona Triflusal Ditazol Indobufeno
	Inhibidores de fosfodiesterasas	Inhibición de la síntesis de fosfodiesterasa limitando la movilización de calcio y la agregación plaquetaria dependiente de calcio.	Dipiridamol Cilostazon Triflusal Prostaciclina
Inhibidores de Receptores	Antagonistas del receptor de la glicoproteína II β /III α (GpIIb/IIIa)	Inhibición del receptor GpIIb/IIIa de la superficie plaquetaria, evitando la unión con el fibrinógeno.	Trigramín Eptifibatide Tirofiba Abcicimab
	Inhibidores de los receptores de adenosina difosfato (ADP)	Bloqueo de los receptores (P2Y1, P2Y12 y P2X), inhibiendo las distintas vías de señalización plaquetaria y funciones en la agregación plaquetaria.	Ticlopidina Clopidogrel Plasugrel

Fuente: Badimon&Vilahur.(Badimon& Vilahur 2013)

1.4.2. Tipos de antiplaquetarios.

Los fármacos que interfieren con la función plaquetaria aceptan varias clasificaciones, en función si atendemos a su mecanismo de acción, modo de administración u objetivo del tratamiento. Así, nos encontramos con antiplaquetarios inhibidores enzimáticos o inhibidores de los receptores de la superficie de las plaquetas; antiplaquetarios orales o intravenosos; y

antiplaquetarios para la prevención primaria (prevención de las enfermedades cardiovasculares), para la fase aguda de la enfermedad, o para la prevención secundaria (prevención de la recurrencia vascular).

La '*American Heart Association/American Stroke Association*' (AHA/ASA) y el '*American College of Chest Physicians*' (ACCP), recomiendan la terapia con antiplaquetarios en la prevención secundaria del ictus isquémico (a excepción del cardioembólico) o del ataque isquémico transitorio (AIT) (Kernan et al. 2014; Lansberg et al. 2012). Estas directrices sugieren el uso de aspirina, clopidogrel o la terapia combinada aspirina-dipiridamol de liberación prolongada, como los tratamientos más recomendables. Así mismo, el ACCP también ha incluido en sus recomendaciones el uso de citosato (Lansberg et al. 2012). Otros fármacos utilizados en la prevención secundaria del ictus son ticlopidina, trifusol o los inhibidores de la glicoproteína II β /III α (GpIIb/IIIa).

Pese a los claros beneficios demostrados, la reactividad plaquetaria es variable y los pacientes no responden de igual modo a este tratamiento. Entre un 10-20% de los pacientes tratados con aspirina o clopidogrel, experimentan eventos vasculares recurrentes (Patrono et al. 2004). Otros estudios indican que la disminución de la mortalidad general se reduce en sólo un 18% de los casos y la reducción de la discapacidad en un 25% (Weber and Diener 2010). Este fenómeno puede ser debido a una resistencia al medicamento por parte del paciente, que generalmente se define como una actividad plaquetaria normal a pesar de una correcta adherencia al tratamiento. Diferentes estrategias se han realizado con la intención de reducir la incidencia de recurrencia vascular, mediante la combinación de fármacos, sin los resultados esperados. Ensayos clínicos y meta-análisis sugieren que seguir una terapia combinada desde el inicio, en comparación con la monoterapia, obtiene una tasa de reducción mayor en ACV recurrente, por el contrario los estudios a largo plazo obtienen datos contradictorios en relación a la terapia dual (Barnes et al. 2007; Hong 2014).

1.4.3. Aspirina

1.4.3.1. Características y Mecanismos de acción

La aspirina fue el primer fármaco antiplaquetario empleado en la clínica y es generalmente la primera opción de tratamiento, ya que puede administrarse en un amplio rango de pacientes y puede ser prescrito para un uso prolongado. Mediante la acetilación de la serina-529, inhibe de forma irreversible la ciclooxigenasa 1 (COX1) evitando la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina G₂/H₂ y consiguientemente la síntesis de tromboxano A₂ (TxA₂) (figura 5). El TxA₂ es una enzima con una fuerte capacidad protrombótica y vasoconstrictora. Además de la

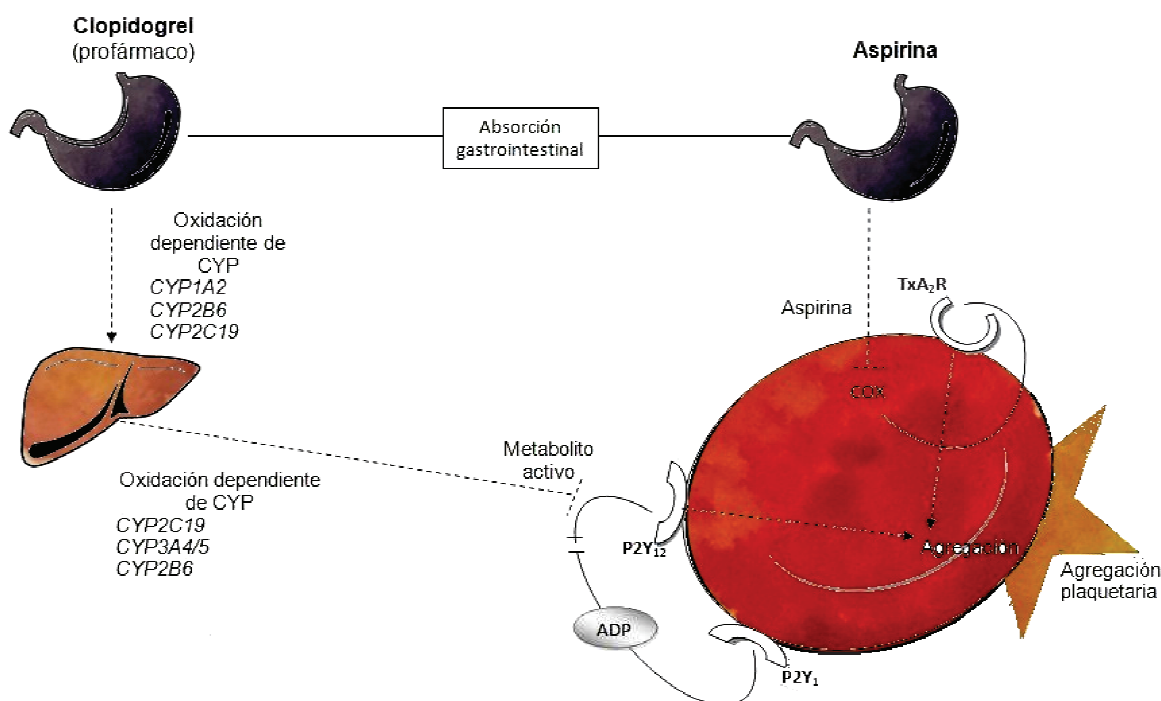
INTRODUCCIÓN

inhibición de TxA₂, también se ha observado que aspirina reduce los niveles de factores plaquetarios 3 y 4, y de factores de coagulación II, VII, IX y X (dosis \geq 200 mg) y presenta cierta actividad fibrinolítica (Badimon, Mendieta, and Vilahur 2014; Tendra and Wojakowski 2003).

1.4.3.2. Administración

La dosis recomendada de aspirina para disminuir la actividad plaquetaria se sitúa ente 50-325 mg/día (Albers et al. 2004), aunque diferentes estudios han observado que las dosis inferiores son igual de efectivas que dosis mayores (Mason, Jacobs, and Freedman 2005; Tendra and Wojakowski 2003). El tratamiento con aspirina tiene un efecto temporal en la inhibición de la función plaquetaria, que vuelve a niveles normales tras 7 días de la última administración (Born and Patrono 2006).

Figura 5: Relación entre antiagregantes y agregación plaquetaria. Metabolismo de clopidogrel y aspirina.



1.4.3.3. Beneficios

Números estudios clínicos han observado que el tratamiento secundario de nuevos eventos isquémicos con aspirina reduce la muerte por causa vascular en un 15% de los casos y en un 30% los eventos no fatales (Antithrombotic Trialists' Collaboration. 2002). Un meta-análisis, que incluía >200.000 pacientes (287 estudios), mostró que el tratamiento prolongado con aspirina disminuía el riesgo de infarto de miocardio agudo (un 33,3%), de ictus isquémico (un 25%) y de muerte por causa vascular (un 16,6%), en pacientes de alto riesgo cardiovascular (Antithrombotic

Trialists' Collaboration. 2002). Así mismo, la efectividad del tratamiento con aspirina no se ve afectado por la edad, sexo, presencia de hipertensión o diabetes (Tendera and Wojakowski 2003).

1.4.4. Clopidogrel

1.4.4.1. Características y Mecanismos de acción

Clopidogrel es un profármaco que necesita ser metabolizado en el hígado para convertirse en el metabolito activo, tiolactona, con actividad antiagregante. Este proceso consta de dos pasos de oxidación y es mediado por varias enzimas hepáticas del citocromo P450 (CYP), entre ellas: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 y CYP3A4/5. La tiolactona es un agonista del ADP, se une de forma irreversible a los receptor P2Y₁₂ de la superficie de las plaquetas y consecuentemente disminuye la activación de los receptores GPII α -III β reduciendo, este modo, la adhesión de las plaquetas (Tendera and Wojakowski 2003) (Figura 5).

1.4.4.2. Administración

A pesar de tratarse de un profármaco, clopidogrel se absorbe rápidamente y tiene una alta biodisponibilidad. En comparación a otros inhibidores de ADP, como la ticlopidina, tiene un perfil de toxicidad más favorable y un menor riesgo de neutropenia y trombocitopenia, además de una inhibición plaquetaria más rápida (especialmente con dosis de carga). Al igual que la aspirina, la función plaquetaria vuelve a niveles normales tras 7 días desde la última dosis (Born and Patrono 2006; Tendera and Wojakowski 2003).

1.4.4.3. Beneficios

En el estudio CAPRI, se observó que los pacientes con enfermedad vascular de tipo aterotrombótico tratados con clopidogrel (75 mg/día) tenían una tasa de reducción de nuevos eventos isquémicos superior (8,7%) a aquellos tratados con aspirina (325 mg/día) (CAPRIE Steering Committee 1996). Este estudio se llevó a cabo en 19.185 pacientes con enfermedades vasculares de tipo aterotrombóticos, ya fueran infarto de miocardio agudo reciente, ictus isquémico reciente o enfermedad arterial periférica sintomática. Los beneficios de clopidogrel fueron superiores en un subgrupo de pacientes con enfermedad arterial periférica (23,8% de reducción de riesgo). No obstante, Diener et al. en un estudio randomizado realizado en 20.332 pacientes con ictus isquémico a lo largo de 35 países, observaron una efectividad similar entre clopidogrel y la combinación de aspirina y

dipiridamol de liberación prolongada, en la prevención secundaria del ictus isquémico (Diener et al. 2008). Clopidogrel también se ha visto más eficaz que aspirina en la prevención de la trombosis aguda del stent después de la implantación de un stent coronario (Müller et al. 2000).

1.5. Resistencia al tratamiento antiplaquetario.

1.5.1. Definición de Resistencia

Se utiliza el término resistencia cuando un paciente no responde al tratamiento antiplaquetario de la forma esperada. Existen numerosos motivos por los que esto puede suceder, algunos de los más comunes son:

- ⊗ **Factores clínicos:** Dosis inadecuada, no correcta adherencia al tratamiento, metabolización incorrecta, interacción con otros fármacos.
 - ⊗ **Factores celulares:** Existencia de rutas alternativas de la activación plaquetaria.
 - Específicos de aspirina: Supresión insuficiente de COX-1, aumento de la expresión de COX-2, aumento de la producción de 8-iso-PGF₂.
 - Específicos de clopidogrel: Alta concentración de ADP libre, diferencias individuales en *P2Y12*.
 - ⊗ **Factores genéticos:**
 - Específicos de aspirina: Polimorfismos en COX-1, en el receptor GPIIb/IIIa entre otros y en el gen *PEAR1*.
 - Específicos de clopidogrel: Polimorfismos en el Citocromo P450 (CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5 y CYP1A2) (Mega et al. 2009; Shuldiner et al. 2009).
- El termino resistencia, engloba tanto la resistencia bioquímica como la resistencia clínica.

1.5.2. Resistencia bioquímica y resistencia clínica

La resistencia bioquímica, también denominada alta reactividad plaquetaria, es la resistencia que se observa mediante test bioquímicos. Los pacientes presentan niveles de agregación plaquetaria normales a pesar del tratamiento con antiplaquetarios. Existen gran variedad de test para estudiar la reactividad plaquetaria (tabla 4), en función de las vías de acción de los fármacos. Desafortunadamente los resultados obtenidos con estas técnicas no se correlacionan entre ellos. Hasta la fecha no existe un consenso sobre que test bioquímico es el más adecuado para medir reactividad plaquetaria.

La resistencia clínica, también conocida como fallo del tratamiento, se define como la aparición de un nuevo evento vascular pese a una correcta administración y adherencia al tratamiento por parte de los pacientes. La relación entre resistencia y bioquímica y resistencia clínica no está clara, pese a que algunos estudios han observado una relación entre ambas, otros no la han podido confirmar (Snoep et al. 2007).

Tabla 4: Principales test bioquímicos para la medición de la agregación plaquetaria y sus características.

Prueba	Medición	Características de la Prueba
Concentración de Tromboxano B₂ en orina y plasma	Medición indirecta de los niveles de COX-1	La inhibición de COX-1 inducida por aspirina reduce la producción de Tromboxano A ₂ .
Agregometría Óptica o por transmisión de luz (LTA)	Medición directa de la agregación de las plaquetas	La transmisión de la luz aumenta a medida que las plaquetas se agrupan en respuesta a los agonistas (ADP, ácido araquidónico, epinefrina, colágeno).
Agregometría por resistencia eléctrica	Medición directa de la agregación de las plaquetas	Mide el cambio en la conductividad eléctrica cuando las plaquetas está agregadas a antagonistas. Es similar al LTA.
Analizador de la función plaquetaria 100 (PFA-100)	Medición indirecta del estrés vascular	La sangre pasa por una membrana, cuanto mayor agregación la apertura se cierra más rápidamente.
VeryfyNow® (Modelos diferentes para aspirina y clopidogrel)	Medición directa de la agregación de las plaquetas	La transmisión de la luz aumenta a medida que las plaquetas se agrupan en respuesta a los agonistas (ADP para clopidogrel; y ácido araquidónico para aspirina).
Ultegra R PFA-ASA	Medición directa de la agregación de las plaquetas	Si aspirina o clopidogrel produce el efecto esperado, no se aglutinará el fibrinógeno y transmisión de la luz no aumentará.
Sistema de mapeo de plaquetas por tromboelastografía	Medición de la formación y rotura de los coágulos	La tromboelastografía mide el poder de coagulación de las plaquetas.
Fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP)	Medición por citometría de flujo	Se mide la señalización de la activación de las plaquetas, mediante P2Y ₁₂ .
Cambios dependientes de la activación en la superficie de las plaquetas.	Medición directa de la agregación de las plaquetas	Se miden los niveles P-selectina y GPIIb/IIIa activo en la superficie de las plaquetas y la agregación entre leucocitos y plaquetas.

Fuente: Greer DM (Greer 2010) y Feher G. (Feher et al. 2010)

1.5.3. Problemática de la resistencia

Como ya se ha comentado a pesar de los beneficios de la terapia antiplaquetaria, entre 10-20% de los pacientes experimentan nuevos eventos vasculares. La aplicación de tratamientos alternativos, como el aumento de la dosis o terapias combinadas (aspirina-clopidogrel o aspirina-dipiridamol) no son siempre una opción segura, ya que en ocasiones pueden incrementar los eventos hemorrágicos enmascarando el potencial beneficio de la terapia. La falta de métodos estandarizados para el diagnóstico de la resistencia a antiplaquetarios y la baja correlación entre los test bioquímicos y la recurrencia vascular (nuevos eventos vasculares), hace que el tratamiento de la recurrencia sea más difícil. Además, también existen condiciones clínicas, como la presencia de diabetes mellitus o haber tenido una intervención cardíaca previa, que actúan como cofactores en la resistencia a los antiplaquetarios. Identificar que pacientes serán resistentes a los estos fármacos, junto con el diseño de nuevos tratamientos más efectivos, son clave para el éxito en la prevención secundaria del ictus y otros eventos vasculares (Greer 2010).

1.6. Farmacogenética y recurrencia vascular

1.6.1. Farmacogenética

La farmacogenética es el estudio de las variantes genéticas que influyen en la respuesta a los fármacos. La aplicación más importante de este campo, es realizar una prescripción guiada de los fármacos con mayor porcentaje de eficacia y el menor riesgo de efectos adversos, de forma específica para cada paciente según sus características genéticas. En los últimos años numerosos estudios se han centrado en identificar las interacciones gen-fármaco, algunos de los cuales han dado lugar a recomendaciones por parte de la *'American Food and Drugs Administration'* (FDA) para realizar test genéticos previos a la prescripción de determinados fármacos.

Posiblemente los hallazgos más importantes en este campo han sido la identificación de varios polimorfismos en genes relacionados con la farmacocinética y la farmacodinámica que contribuyen a la variabilidad en la respuesta. Concretamente aquellos polimorfismos funcionales en los genes que codifican para las enzimas CYP. Estas enzimas están involucradas en el metabolismo del 85% de los fármacos, incluyendo antiplaquetarios como clopidogrel. Los polimorfismos identificados causan funciones alteradas de las enzimas CYP, que clasifican a las personas en: Metabolizadores pobres (MP), aquellos con actividad pobre o baja; Metabolizadores intermedios (MI), actividad intermedia; Metabolizadores extensivos (ME), actividad normal; y Metabolizadores Ultrarápidos (MU) actividad normal o incrementada (Scott et al. 2013). Esta clasificación también se hace extensible a otros fármacos que no requieren ser biotransformados por las enzimas CYP. Para clopidogrel, los MU provocarán un incremento en la inhibición

plaquetaria (respecto a los ME) puesto que se produce más metabolito activo. En el caso de aspirina, u otros fármacos no metabolizados por los CYP, los MU presentan niveles plasmáticos inferiores del fármaco que comportan una menor inhibición plaquetaria.

1.6.2. Farmacogenética de la Aspirina

Se ha propuesto en varias ocasiones que la variabilidad en la respuesta a aspirina pueda tener un trasfondo genético. En este sentido se han realizado numerosos estudios de genes candidato, en los que se estudiaban polimorfismos en genes directamente asociados con la agregación plaquetaria y las vías metabólicas de aspirina (*COX-1*, *COX-2*, *GPI α* , *GPI β* , *GPIII α* , *CPIV*, *FXIII*, *P2Y1*, *P2Y12*) (Goodman, Ferro, and Sharma 2008). Estos estudios, en su mayoría, se han llevado a cabo en tamaños muestrales pequeños y no se realizaron estudios de validación en cohortes independientes, lo que no permite confirmar los resultados. Además, hasta la fecha se han realizado pocos GWAS para determinar el componente genético de la resistencia a aspirina.

1.6.2.1. Estudios de genes candidato

Halushka et al. identificaron dos polimorfismos en el *COX-1* relacionados con una mayor inhibición plaquetaria en individuos sanos (Halushka, Walker, and Halushka 2003). Dos estudios posteriores observaron los mismos resultados en pacientes de enfermedad coronaria. Un meta-análisis en el que se incluyeron 31 estudios, con un total de 50 polimorfismos en 11 genes, concluyó que el polimorfismo *P11/A2* del receptor *GPIII α* se asociaba de forma significativa con la resistencia a aspirina pero solo en individuos sanos pero no en aquellos con enfermedad cardiovascular (Goodman et al. 2008). Este mismo meta-análisis también observó que no había relación entre la resistencia a aspirina y otros polimorfismos en cuatro genes (*CPI α* , *COX-1*, *P2Y12* y *P2Y1*) (Goodman et al. 2008).

Hasta la fecha los polimorfismos en el gen que codifica el receptor endotelial de la agregación plaquetaria 1 (*PEAR1*), son las únicas variantes genéticas que se han asociado con la resistencia a aspirina y han sido confirmadas por estudios independientes posteriores. *PEAR1* es una proteína transmembrana localizada en las plaquetas que se activa al ponerse en contacto con otras plaquetas. Herrera-Galeano et al. tras genotipar 10 SNP de *PEAR1* en 1.486 individuos aparentemente sanos (procedentes de familias con dos generaciones con enfermedad coronaria prematura), tratados con aspirina durante dos semanas, observaron que uno de los polimorfismos (rs2768759) se asociaba con una mayor agregación plaquetaria (Herrera-Galeano et al. 2008). Más recientemente, un estudio danés, ha identificado otro polimorfismo en *PEAR1* (rs12041331) asociado una menor agregación plaquetaria y una mayor activación plaquetaria, pero no con la

INTRODUCCIÓN

actividad de la COX1 (Würtz et al. 2014), en pacientes con enfermedad cardiovascular tratados con aspirina (75 mg/día).

1.6.2.2. Estudios GWAS

Hasta la fecha se han realizado escasos estudios GWAS para identificar el componente genético de la resistencia a aspirina. Johnson et al. estudiaron dos cohortes de forma simultánea, mediante agregometría óptica, una procedente del *Framingham Heart Study* y otra del *Genetic Study of Atherosclerosis Risk*, con 2.753 y 1.238 individuos sanos respectivamente (Johnson et al. 2010). En este estudio se identificaron siete loci asociados con la resistencia a aspirina. Todos los resultados fueron replicados en una tercera cohorte de 840 individuos, procedentes del estudio *Genetic Study of Atherosclerosis Risk*. Uno de los resultados más llamativos fue la asociación del SNP rs12566888 ($p = 3,4 \times 10^{-12}$) situado en *PEAR1* (Johnson et al. 2010).

Posteriormente, se asoció un polimorfismo en *PEAR1* con la respuesta a aspirina (rs12041331, el mismo identificado en el estudio de Würtz M et al.) (Lewis et al. 2013). En este estudio se midieron los niveles de agregación plaquetaria en 565 pacientes procedentes del estudio PAPI (*Pharmacogenomics of Antiplatelet Intervention*) antes y después del tratamiento con aspirina. Los resultados más significativos fueron genotipados en dos nuevas cohortes (227 pacientes con intervención plaquetaria y 1.000 pacientes del estudio INVEST-GENES, donde se replicó la asociación de rs12041331 con la reactividad plaquetaria ($p < 7,66 \times 10^{-09}$) (Lewis et al. 2013).

Un GWAS más reciente, ha identificado dos nuevos SNPs (rs11202221 y rs6566765) además de confirmar rs12041331 (*PEAR1*), asociados con la agregación plaquetaria inducida por ADP (Qayyum et al. 2015). En una primera fase del estudio se genotiparon 825 afroamericanos procedentes del estudio GeneSTAR y los resultados fueron replicados en dos cohortes: 119 afroamericanos y 1.221 americanos de origen europeo. Tras la fase de descubrimiento la asociación con rs12041331 fue replicada en ambas poblaciones, afroamericana y europea, mientras el SNP rs11202221 sólo se replicó en afroamericanos y rs6566765 en la cohorte de americanos de origen europeo. Hasta la fecha, los SNPs en el gen *PEAR1* son los únicos cuya asociación con la reactividad plaquetaria ha sido confirmada, para pacientes tratados con aspirina.

1.6.2.3. Problemática no efectividad

Numerosos estudios han tratado de abordar la relación entre la reactividad plaquetaria, el tratamiento con aspirina y el riesgo de nuevos eventos vasculares. Algunas observaciones clínicas han sugerido que esta relación es tan sólo ocasional. Por ejemplo, las variantes genéticas identificadas hasta el momento asociadas con la reactividad plaquetaria o la recurrencia vascular,

no explican toda la variabilidad observada en la resistencia a aspirina. En un estudio en donde se evaluaron 11 SNPs previamente asociados con los niveles de actividad plaquetaria y el tratamiento con aspirina (n = 3.449 casos con enfermedad cardiovascular y n = 11.754 controles), los autores no observaron un mayor riesgo de muerte, IM, o ictus en aquellos que presentaban las variantes de riesgo (Voora et al. 2011). Evidenciando, que la utilización de estos SNPs para guiar una terapia con antiplaquetarios todavía no está justificada.

1.6.3. Farmacogenética del Clopidogrel

En estudios recientes se han observado asociaciones entre diferentes polimorfismos y la variabilidad en la respuesta a los tres grupos principales de antiplaquetarios: aspirina, clopidogrel (y otros inhibidores de receptores ADP) e inhibidores de los receptores GPIIb-IIIa (Verschuren et al. 2012).

En el caso de clopidogrel, los estudios de genes candidatos se centraron principalmente en los genes del citocromo P450, en los cuales se encontraron polimorfismos asociados a la resistencia en *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2B6*, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *CYP1A2* (Mega et al. 2009). También se han identificado SNPs en los genes *P2RY12*, *ABCB1* y *PON1*, aunque no han sido validados posteriormente (Yin and Miyata 2011).

1.6.3.1. Estudios de genes candidato

Mega et al. observaron que la presencia de al menos una copia del alelo *CYP2C19**2 se asociaba con niveles un 32,4% inferiores del metabolito activo de clopidogrel ($p < 0,001$), y con una reducción absoluta en los niveles máximos de agregación plaquetaria en respuesta a clopidogrel ($p < 0,001$) en individuos sanos (Mega et al. 2009). En el mismo estudio, los portadores del alelo de riesgo *CYP2C19* presentaron un incremento del 53% del riesgo relativo de muerte por causa vascular en pacientes con síndrome coronario agudo tratados con clopidogrel. Otro estudio, en el que se genotiparon polimorfismos de *CYP2C19*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *P2RY12* y *ITGB3* en 2.208 pacientes con infarto de miocardio, se observó que aquellos pacientes que tenían el alelo de riesgo en *CYP2C19* y *ABCB1* presentaban un mayor riesgo de ictus, muerte por causa vascular, o infarto de miocardio, durante el primer año de seguimiento en comparación a con el genotipo salvaje (Simon et al. 2009).

Cui et al. identificaron los SNPs rs4244285 (*CYP2C19*) y rs342293 (7q22.3) asociados con la reactividad plaquetaria medida mediante VerifyNow® *P2Y12* en pacientes tratados con clopidogrel (ambos $p < 0,01$). Los resultados obtenidos con VerifyNow® Aspirin, fueron menos significativos, (rs5445 *GNB3*, $p = 0,049$; rs5758 *TBXA2R*, $p = 0,045$) (Cui et al. 2015). En este

INTRODUCCIÓN

estudio de genes candidato se reclutaron 286 individuos de origen asiático tratados con antiplaquetarios durante al menos 2 semanas, 159 tratados con dosis única 100 mg/día de aspirina y 127 tratados con terapia dual 100 mg/día de aspirina y 75 mg/día de clopidogrel.

Un estudio reciente ha observado mecanismos epigenéticos asociados con una alta reactividad plaquetaria. Su et al. analizaron los niveles de metilación en el promotor de *P2Y12* en 49 pacientes con resistencia a clopidogrel y 57 no resistentes, identificados mediante los niveles de actividad plaquetaria (VerifyNow® *P2Y12*). En pacientes con abuso de alcohol se observaron niveles de metilación más bajos del promotor asociados con una peor respuesta a clopidogrel (CpG1, $p = 0,009$; CpG2, $p = 0,022$) (Su et al. 2014). Además la CpG1 se correlacionó inversamente con la resistencia a clopidogrel en pacientes fumadores ($p = 0,026$) y en el subgrupo de albúmina < 35 ($p = 0,002$).

1.6.3.2. Estudios GWAS

Hasta el momento se ha realizado un único estudio GWAS para identificar el componente genético de la resistencia a clopidogrel (Shuldiner et al. 2009). En el estudio PAPI se administró clopidogrel durante 7 días a 429 personas de origen Amish. Tras este periodo se midió la respuesta al fármaco mediante agregometría plaquetaria, usando ADP como antagonista. Se observó una alta heredabilidad ($h^2 = 0,73$, $p < 0,001$) en la respuesta plaquetaria a clopidogrel y se identificaron trece SNPs en el cluster *CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8* asociados con una baja respuesta a clopidogrel. El polimorfismo rs14777823, además de haber obtenido el resultado estadísticamente más significativo ($p < 1,5 \times 10^{-13}$), también se encontraba en desequilibrio de ligamiento con una de las variantes previamente descritas asociadas a la resistencia a clopidogrel (*CYP2C19*2*, $r^2 = 0,87$). Estos resultados fueron replicados en una segunda fase del estudio donde se genotipo *CYP2C19*2* en una nueva cohorte de 227 pacientes sometidos a una intervención coronaria. Los pacientes con la variante de riesgo (*CYP2C19*C*) presentaron un mayor riesgo de eventos isquémicos (20,9% vs 10%) durante el periodo de seguimiento de un año (Shuldiner et al. 2009).

1.6.3.3. Problemática, la no efectividad

La mayoría de estudios en los que se han identificado SNPs asociados con la resistencia a clopidogrel se investigaba principalmente la relación entre genética y agregación plaquetaria. Pocos estudios son los que han observado una relación entre estos SNPs y la resistencia clínica (recurrencia vascular) o la relación entre resistencia bioquímica y resistencia clínica (Holmes et al. 2011). Así, la posible relación entre variantes genéticas y el riesgo de sufrir eventos vasculares recurrentes aún no está clara. Holmes et al. realizaron un meta-análisis y revisión de la

bibliografía, en el que examinaron 32 artículos los cuales evaluaban la capacidad predictiva de *CYP2C19* en la respuesta a clopidogrel. Del total de estudios analizados sólo 6 de ellos eran randomizados, en los cuales se estudió la relación entre el genotipo de *CYP2C19* y la aparición de problemas cardiovasculares mayores, incluyendo hemorragias. Los restantes 26 estudios examinaban la relación entre *CYP2C19* y los niveles de metabolito activo, reactividad plaquetaria y nuevos eventos vasculares. El resultado de este estudio mostró evidencias de una asociación significativa entre *CYP2C19* y nuevos eventos vasculares (Holmes et al. 2011).

1.6.3.4. Controversia FDA

Los resultados obtenidos por los estudios farmacogenéticos mediante genes candidato junto con el GWAS que demostraban la asociación de los polimorfismos de los CYPs con la reactividad plaquetaria llevó a que la FDA, en marzo del 2010, recomendará la genotipación de *CYP2C19* antes de prescribir clopidogrel. Dado que el mayor número de casos de recurrencia se dan al inicio del tratamiento, la identificación del genotipo del paciente previo al inicio del tratamiento, permitiría adaptar la medicación a las características de cada persona, evitando nuevos eventos. Esta decisión levantó bastante polémica (Nissen 2011), American Heart Association y American College of Cardiologist sostuvieron que por el momento no existen suficientes evidencias que justifiquen la realización de este tipo de análisis genético de forma rutinaria (Holmes et al. 2010). Por el contrario, en mayo de 2013, el Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) propuso genotipar *CYP2C19* antes de iniciar tratamiento con clopidogrel, sobretodo en pacientes con síndrome coronario agudo sometidos a intervención coronaria (Scott et al. 2013).

HIPÓTESIS



2. HIPÓTESIS

Modificaciones epigenéticas, como la metilación diferencial del ADN, pueden estar asociadas a la respuesta al tratamiento antiplaquetario en pacientes que han sufrido un ictus isquémico.

OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre los estudios farmacogenéticos relacionados con la respuesta al tratamiento antiplaquetario (aspirina o clopidogrel) en la prevención secundaria del ictus isquémico.
2. Evaluar la validez de la estrategia de pools de ADN en los estudios realizados con arrays de metilación de genoma completo (EWAS).
3. Determinar si alteraciones en el metiloma están asociadas a la recurrencia vascular en pacientes con ictus isquémico tratados con clopidogrel.
4. Determinar si alteraciones en el metiloma están asociadas a la recurrencia vascular en pacientes con ictus isquémico tratados con ácido acetil salicílico.

ARTÍCULOS

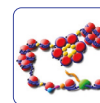


4.1. ARTÍCULO 1

**DNA methylation levels are highly correlated between pooled samples and averaged values
when analysed using the Infinium**

Cristina Gallego-Fabrega, Caty Carrera, Elena Muiño, Joan Montaner³, Jurek Krupinski, Israel
Fernandez-Cadenas* and On behalf of Spanish Stroke Genetics Consortium

Clinical epigenetics 2015. 7(1):78.



METHODOLOGY

Open Access



DNA methylation levels are highly correlated between pooled samples and averaged values when analysed using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip array

Cristina Gallego-Fabrega^{1,2}, Caty Carrera³, Elena Muiño¹, Joan Montaner³, Jurek Krupinski^{4,5}, Israel Fernandez-Cadenas^{1*} and On behalf of Spanish Stroke Genetics Consortium

Abstract

Background: DNA methylation is a heritable and stable epigenetic mark implicated in complex human traits. Epigenome-wide association studies (EWAS) using array-based technology are becoming widely used to identify differentially methylated sites associated with complex diseases. EWAS studies require large sample sizes to detect small effects, which increases project costs. In the present study we propose to pool DNA samples in methylation array studies as an affordable and accurate alternative to individual samples studies, in order to reduce economic costs or when low amounts of DNA are available. For this study, 20 individual DNA samples and 4 pooled DNA samples were analysed using the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array to evaluate the efficiency of the pooling approach in EWAS studies. Statistical power calculations were also performed to discover the minimum sample size needed for the pooling strategy in EWAS.

Results: A total of 485,577 CpG sites across the whole genome were assessed. Comparison of methylation levels of all CpG sites between individual samples and their related pooled samples revealed highly significant correlations ($\rho > 0.99$, $p\text{-val} < 10^{-16}$). These results remained similar when assessing the 101 most differentially methylated CpG sites ($\rho > 0.98$, $p\text{-val} < 10^{-16}$). Also, it was calculated that $n = 43$ is the minimum sample size required to achieve a 95 % statistical power and a 10^{-06} significance level in EWAS, when using a DNA pool strategy.

Conclusions: DNA pooling strategies seems to accurately provide estimations of averaged DNA methylation state using array based EWAS studies. This type of approach can be applied to the assessment of disease phenotypes, reducing the amount of DNA required and the cost of large-scale epigenetic analyses.

Background

Epigenetics refers to the stable, heritable and reversible modifications in DNA expression associated with transcriptional regulation without alterations in the nucleotide sequence [1]. Epigenetic processes such as DNA methylation (DNAm), histone acetylation/deacetylation, non-coding mRNA expression and chromatin conformational changes [2] are essential for normal cellular development and differentiation. They have also been

linked to some monogenic and complex human diseases [3, 4]. Nowadays DNA methylation is one of the most studied epigenetic modifications [5, 6] and alterations in methylation have been linked with some disease processes such as different types of cancer [4, 7, 8], as well as with aging and exposure to tobacco smoke [9–12].

Some of the most important technologies used to detect DNA methylation are: deep sequencing, high-throughput deep sequencing and array-based genome-wide studies such as Epigenome Wide Association (EWAS) [13].

In the “omics” era, Genome-wide Association Studies (GWAS) have been widely used to discover the genetic polymorphisms associated with human diseases. These

* Correspondence: israelcadenas@yahoo.es

¹Stroke pharmacogenomics and genetics, Fundació Docència i Recerca Mutua Terrassa, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, C/ Sant Antoni 19, 08221 Terrassa, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

studies have been more successful in finding genes associated with complex diseases, compared to classical candidate genes studies. However, GWAS needs higher sample sizes and specific arrays that increase project costs. Several papers have observed that the use of pooling strategies decreases the cost of GWAS, while providing similar results to individual sample analysis [14].

Pearson and colleagues reported that pooling-based GWAS was theoretically effective in identifying genetic associations in different types of disease [15]. Applying these methods to experimental case-control data, they also demonstrated the successful identification of previously published susceptible loci for a rare monogenic disease, a rare complex disease and a common complex disease. In addition, Gaj et al. confirmed previously reported loci for colorectal cancer and prostate cancer in a Polish population, with a pooled-based strategy using GWAS [16].

Epigenome-wide association studies (EWAS) use the same strategy as GWAS, but for epigenetics. EWAS use array-based genotyping technology to detect the methylation levels at CpG sites across the genome. EWAS of human diseases are becoming increasingly common [4, 7, 17, 18]. Like GWAS, the EWAS are hypothesis-free approaches to finding differentially methylated sites instead of different allele frequencies. Nevertheless, pooled DNA strategies might be an affordable alternative that reduces study costs in array-based EWAS.

No current studies have analysed the accuracy of DNA pooling strategies in array-based EWAS. Our aim is thus to analyse the pooling strategies in EWAS studies in order to determine the effectiveness of these approaches in studying DNA methylation patterns in human samples.

In the present study, data from 20 individual DNA samples and 4 pooled DNA samples, analysed with the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip, were used to estimate the feasibility of the pooling approach, comparing the results of the individual samples to the results of the DNA pools of the same samples.

Results and discussion

Quality control

A total of 485,577 CpG sites across the whole genome were assessed using the Illumina HumanMethylation450 BeadChip, in 20 individual samples and 4 DNA pools. First, the distribution of methylation level was evaluated for all samples, with DNA pools showing the same behaviour as individual samples (Fig. 1). Before the quantile normalization, 33,301 CpG sites and no samples were removed due to QC issues.

Correlations

Data revealed highly significant correlations (p -value $< 10^{-16}$, Spearman's test) after comparing the data generated from

the pooled DNA samples with the averaged results of the individual samples. Group A and group B samples were studied separately with their respective pools, the obtained correlations were $\rho = 0.9922$ (p -values $< 10^{-16}$) for group B and $\rho = 0.9914$ (p -value $< 10^{-16}$) for group A. (Fig. 2).

In addition, a second confirmation test was performed to assess the potential to estimate accurate β -values in the most significant differentially methylated CpGs when using a DNA pool strategy in EWAS. A comparison between all CpGs between group A and group B was performed and the most significant CpG sites ($n = 101$), p -val $< 10^{-05}$, were selected. Highly significant correlations (p -val $< 10^{-16}$) were also observed when analysing the 101 selected CpGs between group A and their pooled samples and between group B and their pooled samples (Group A: $\rho = 0.9808$, p -value $< 10^{-16}$; Group B: $\rho = 0.9872$, p -value $< 10^{-16}$) (Fig. 3).

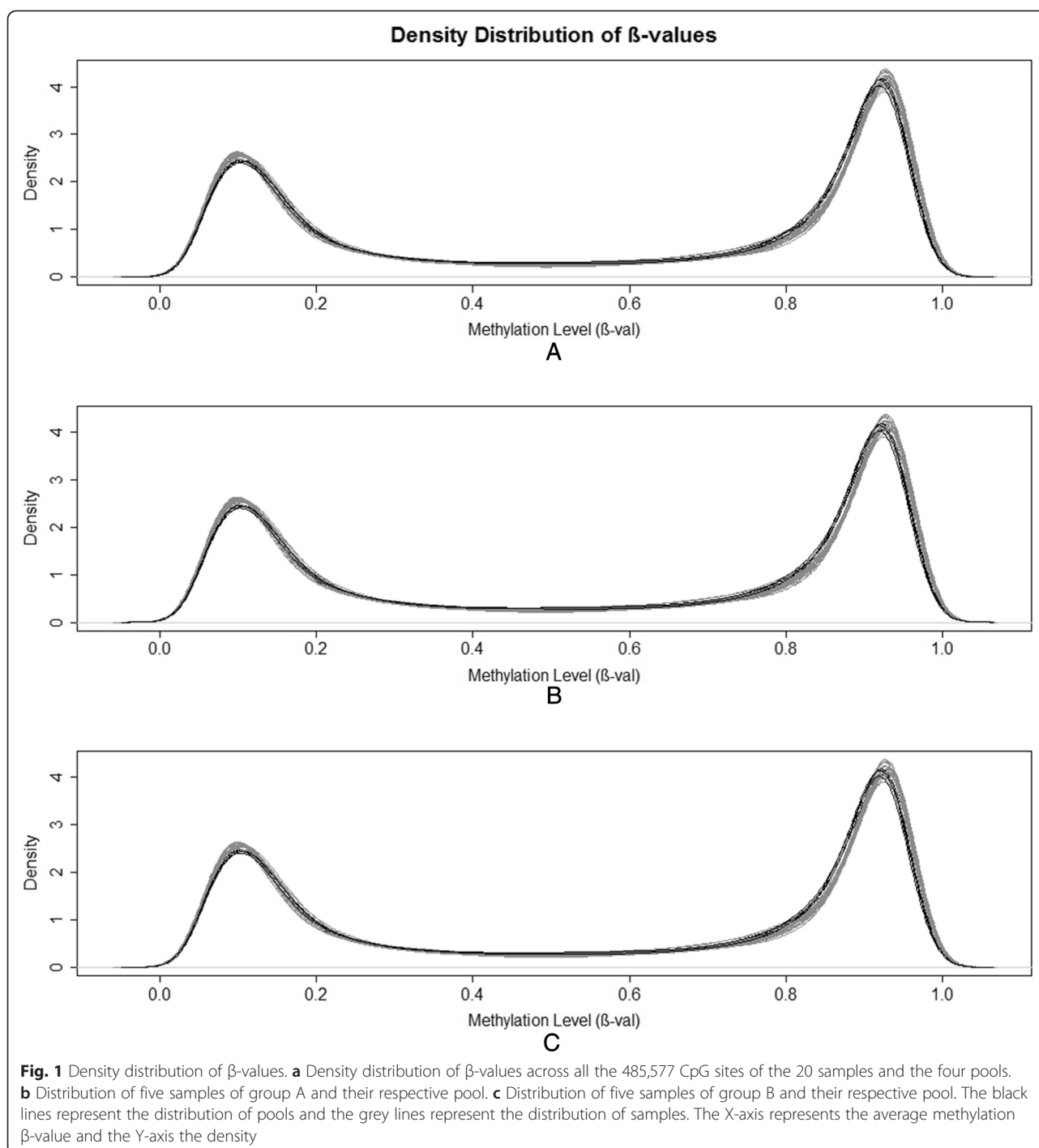
Sample size

Using values from the most significant DMC of pooled samples in the EWAS study, the optimum sample size to reach a 95 % statistical power and a 10^{-6} significance level, should be from 43 to 100 pooled samples per condition, considering Cohen's d effect sizes of 1.5 to 0.95 respectively.

The accuracy and reproducibility of DNA pools for methylation array, using the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array, was investigated by comparing data obtained from individual samples and the same samples after they had been pooled.

Our data indicate that the DNA methylation profile (β -values of CpG sites) from the pooled DNA samples using array technology are highly consistent with those obtained from the individual samples, even when evaluating the most significant DMCs separately (Group A: $\rho = 0.9808$, p -value $< 10^{-16}$; Group B: $\rho = 0.9872$, p -value $< 10^{-16}$).

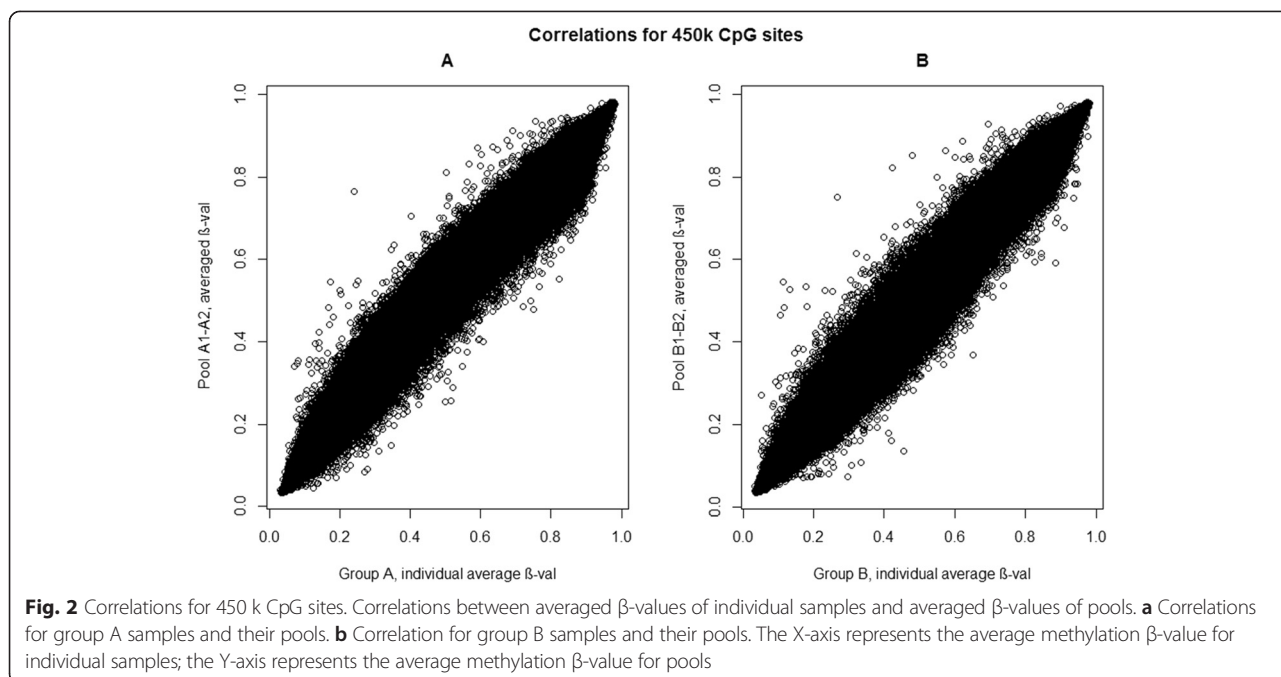
A previous study analysing pooling strategies in methylation studies demonstrated that pools could be an alternative technique when small amounts of DNA are available or when a reduction in cost is necessary to undertake the experiments. In the study, Docherty et al. showed a correlation between 89 individual samples and 4 pool samples in 205 CpG sites spanning 9 genomic regions using Sequenom EpiTYPER [19]. The overall correlation value in the study was 0.95 with a p -value $< 2.210^{-16}$, similar to the results that we observed. However, in our study we found that pooling strategies can be also performed assessing whole genomes in array-based EWAS experiments, analysing more than 450,000 CpG sites. This finding expands the possibilities of Genome Wide studies in epigenetics. In a pooling-based GWAS study, Pearson et al. demonstrated successful identification of published genetic susceptibility loci for some human



diseases: *APOE- $\epsilon 4$* in Alzheimer disease, *MAPT* in progressive supranuclear palsy and *TSPYL* in sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome (SIDDT) [15]. In EWAS we have yet to confirm whether previously reported genes can be found using pooling strategies. However, the higher correlation of the methylation levels between pools and individual samples indicates that the pooling strategies

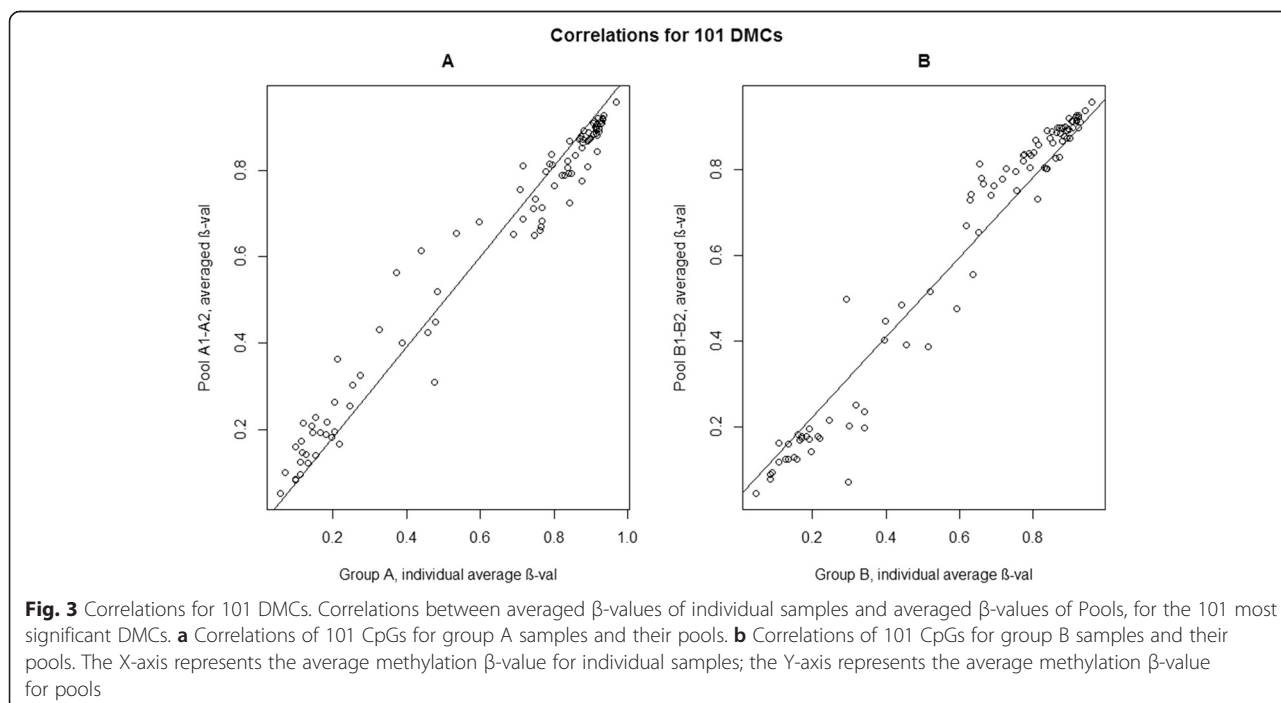
in EWAS are an accurate and interesting strategy to reduce time costs and DNA amount in such experiments.

Even though a DNA pooling strategy has important advantages, there are several drawbacks that have to be considered in the study design. Pool construction has to be really precise. DNA quantities have to be really accurate to assure that each sample in the pool provides equal



quantities of DNA in order to minimize technical errors that may alter the estimated methylation levels [14, 20]. Only mean methylation levels, and not individual methylation data, can be obtained from pooled samples. In addition, adjusting for covariates is almost impossible, unless pooled samples are very homogeneous. Population stratification needs to be excluded. Furthermore,

the error rate tends to be higher in pooled samples compared to individual ones [21]. It is also important in the study design for EWAS with pooled samples to take into account the sample size needed to compute DMCs with confidence. According to the results obtained in our study, we suggest analysis of at least $n = 43$ pooled samples per condition in order to achieve a 10^{-06}



significance level and 95 % statistical power, considering a Cohen's *d* effect size =1.5. However, this number may vary depending on a study's characteristics.

In summary, this is the first study that analyses a pooling strategy in EWAS approaches, it found that this strategy is an acceptable alternative to regular individual EWAS analysis, mainly in specific situations such as when lower quantities of DNA are available, or in studies with a limited budget.

Conclusions

The analysis of the data generated by 450,000 CpG sites across the whole genome in 20 individual samples demonstrates that DNA pooling strategies can be used to provide estimations of averaged DNA methylation state using the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. This approach may be useful to highlight genome regions to be studied in further epigenetic analysis, reducing the costs and the amount of DNA required.

Methods

Sample selection and pool construction

A total of 20 subjects from our biobank were selected. Of these 20 subjects, 10 were ischemic stroke patients with vascular recurrence (this selection was performed randomly from the patients with vascular recurrence) (group A). These patients were then matched one-to-one with 10 ischemic stroke patients without vascular recurrence (group B). The matching categories were age (± 7 years), sex, TOAST classification [19] and recruitment hospital. Next, two pooled samples were constructed with samples from group A (PoolA1 and PoolA2), and two pooled samples were constructed with samples from group B (PoolB1 and PoolB2), as described in Fig. 4. PoolB1 included the matched samples of PoolA1 and correspondingly PoolB2 included the matched samples of PoolA2. All individuals were

Table 1 Population characteristics

		Total	Group A	Group B
Gender	<i>N</i>	20	10(50 %)	10 (50 %)
	Age	72,25 \pm 8.4	72,5 \pm 8.4	72 \pm 8.7
	Male	16 (80 %)	8 (40 %)	8 (40 %)
	Female	4 (20 %)	2 (10 %)	2 (10 %)
TOAST ^a	Atherothrombotic	8 (40 %)	4 (20 %)	4 (20 %)
	Undetermined	4 (20 %)	2 (10 %)	2 (10 %)
	Unknown	2 (10 %)	1 (5 %)	1 (5 %)
	Lacunar	6 (30 %)	3 (15 %)	3 (15 %)

Demographic and clinical variables of the studied population

^aTOAST classification of ischemic stroke

Caucasian, while 16 were males and 4 were females, mean age was 71 ± 8 years (Table 1).

DNA purification and sample pooling

Total genomic DNA was extracted from whole blood samples using the Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The samples were maintained at -20 °C until the EWAS analysis.

DNA concentrations for each subject were determined individually, by measuring ultraviolet (UV) light absorption at 260 nm, with NanoDrop 2000 UV-vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Redwood City, CA, USA). Adapting the instructions of previous DNA pooling protocols [14, 15], each sample was diluted to 40 ng/ μ l, and their DNA concentration was measured again to verify that all samples provide the same amount of DNA to the pools. Samples with DNA concentration variations higher than 40 ng/ μ l ± 4 were discarded and diluted again. Individual DNA samples were then added to their respective pool (4 μ l at 40 ng/ μ l of each sample). Once each pool was generated, the DNA concentrations were re-quantified twice with NanoDrop to assure that the final concentration of the pool was as expected (40 ng/ μ l). If any discrepancy was found ($> \pm 4$ ng/ μ l), the pool was

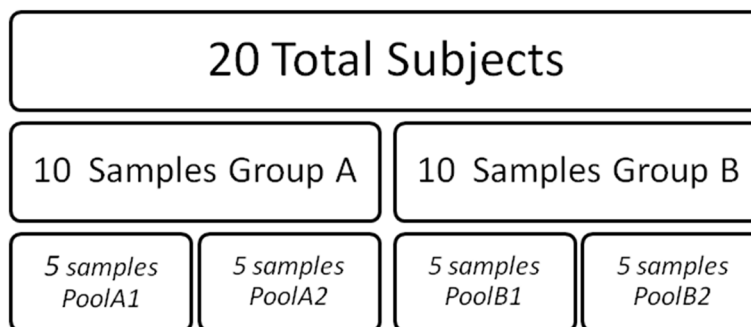


Fig. 4 Study design. A total of 20 subjects from the biobank study were selected for this study, 10 of them form group A and 10 form group B. Two pools were created from group A, with 5 samples in each one (PoolA1 and PoolA2), and two more pools of 5 samples were created from group B (PoolB1 and PoolB2)

generated again repeating all steps from sample DNA measures. Only when the final pool concentration was $40 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ and the total volume was $20 \mu\text{l}$ as expected was the EWAS analysis started. A graphical description of the procedure can be found in Fig. 5.

Epigenome wide association analysis

Genome-wide DNA methylation was assessed using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, Ca). This chip-based study quantitatively measures more than 450,000 CpG sites at single nucleotide resolution with a 99 % coverage of RefSeq Genes.

A Quality Control (QC) of all samples was performed as a first step to check DNA integrity using Invitrogen E-Gel 1 % Agarose Gels. The DNA samples showed no fragmentation or poor quality.

Genomic DNA from the 20 samples and the 4 pools was bisulphite converted using the Zymo EZ DNA MethylationTM Kit (Zymo Research, Orange, Ca) following

the manufacturer's instructions, but with alternative incubation conditions suggested for the Illumina Infinium Methylation Assay. All samples were processed in a single working batch using the Illumina Infinium MSA4 protocol, which includes amplification, fragmentation, hybridization and BeadChip scanning.

For QC, the fluorescence data generated for each CpG locus was analysed with the Illumina GenomeStudio software package. Samples and CpG sites with fluorescence detection p-values > 0.05 were removed [22]. This p-value is the detection p-value that represents the confidence that a given methylation level on a CpG site can be considered to have been detected.

Quality control and normalization

All pre-processing, correction and normalization steps were implemented using the R computing environment (versions 2.15.1 and 3.0.1) with Bioconductor packages. Plots were produced using R functions. The pipeline was

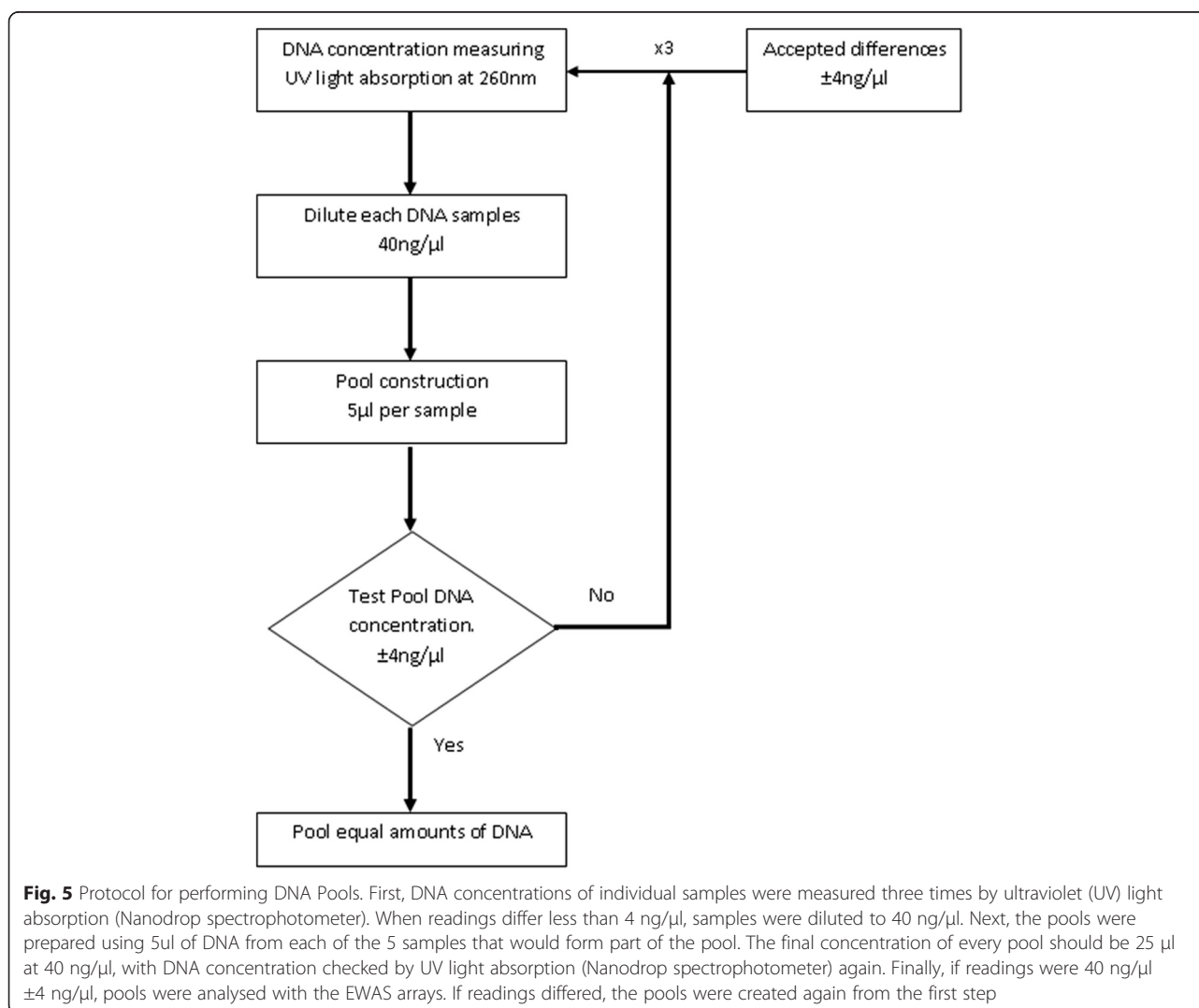


Table 2 R packages and instructions. Specific instructions used from each R package

R package	Instruction	Description
methylumi	methylumiR	Load Illumina methylation data into a MethylumiSet object.
minfi	densityPlot	Density plots of methylation Beta values.
watRmelon	pfilter	Filter data sets based on bead count and detection p-values
minfi	mDSPlot	Multi-dimensional scaling (MDS) plots showing a 2-d projection of distances between samples.
watRmelon	dasen	Calculate normalized betas from Illumina 450 K methylation arrays.
lumi	estimateBetas	Estimate methylation Beta-value matrix from eSet-class object (include methylated and unmethylated probe intensities)

a sequence of R scripts adapted from the methylumi [23] (version 2.6.1), lumi [24] (version 2.12.0), watermelon [25] (version 1.0.3) and minfi [22] (version 1.6.0) packages. The instructions that were used are shown in Table 2.

Prior to the identification of differentially methylated CpG sites, data was pre-processed using a non-specific filter step. This step consists of removing CpG sites with detection p-value ≥ 0.05 in more than 1 % of the samples. Samples with detection p-value ≥ 0.05 in more than 1 % of the CpG sites, and CpG sites with beadCount < 3 in 5 % of samples [16]. CpG sites containing documented single nucleotide polymorphisms (SNPs) were also removed [26]. Multidimensional scaling (MDS) plots were used to evaluate gender outliers based on chromosome X data, where males and females were separated into two distinct clusters. An MDS plot was also used to check for unknown population structures, inside the sample. Then, CpG sites on the X and Y chromosomes were removed [8]. Finally, a subset quantile normalization was performed using a background adjustment between-array normalization and a dye bias correction, following previous recommendations [27, 28].

Statistical analysis

All statistical analysis was also performed using R (version 3.0.1). The accuracy of DNA methylation level estimations from pooled DNA was assessed with a Spearman's correlation, for non-parametric samples, between the β -values of each pool and the averaged β -values of the individual samples included in each pool [19].

We also performed a Spearman's correlation between the β -values of the 101 most differentially methylated CpGs (DMCs) found in individual samples (Group A vs. Group B) and the β -values of the same CpG sites in pools. Differentially methylated CpG sites were determined by the Mann–Whitney U-test for non-parametric

samples using the β -values, p -val $< 10^{-06}$ adapted from Rakyan VK et al. [4]. The DMCs analysis was performed comparing group A samples ($n = 10$) against group B samples ($n = 10$).

Minimum sample size needed for pool analysis in EWAS was calculated using the *pwr* package [29] with implemented power analysis as outlined by J. Cohen, 1988.

Ethical considerations

Ethical approval has been obtained from the ethical committee of the Vall d'Hebron Hospital (PR(AG) 03/2007). All patients were provided with oral and written information about the project, and each participant signed the informed consent for the study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CGF participated in the design of the study, carried out the statistical analysis and drafted the manuscript, CC carried out the statistical analysis, EM carried out the statistical analysis, JM participated in patient inclusion and in manuscript preparation, JK participated in patient inclusion and in manuscript preparation, IFC designed the study and participated in manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The Laboratory of Stroke Pharmacogenomics and Genetics is part of the International Stroke Genetics Consortium (ISGC, www.strokegenetics.com) and coordinates the Spanish Stroke Genetics Consortium (Genestroke, www.genestroke.com). I. F.-C. is supported by the Miguel Servet programme (CP12/03298), Instituto de Salud Carlos III. This study was funded by the Miguel Servet grant (Pharmastroke project: CP12/03298) and by the Fundació Docència i Recerca MutuaTerrassa, Hospital Universitari Mutua de Terrassa grant (EXCLOP project).

The Neurovascular Research Laboratory receives grants from the Spanish stroke research network (INVICTUS) and the European Stroke Network (EUSTROKE 7FP Health F2-08-202213).

Author details

¹Stroke pharmacogenomics and genetics, Fundació Docència i Recerca Mutua Terrassa, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, C/ Sant Antoni 19, 08221 Terrassa, Barcelona, Spain. ²School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ³Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ⁴Servicio de Neurología, Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain. ⁵School of Healthcare Science, Manchester Metropolitan University, Manchester, UK.

Received: 31 March 2015 Accepted: 22 June 2015

Published online: 31 July 2015

References

- Langevin SM, Kelsey KT. The fate is not always written in the genes: epigenomics in epidemiologic studies. *Environ Mol Mutagen*. 2013;54:533–41.
- Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res*. 2008;647:30–8.
- Jiang Y-H, Bressler J, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:479–510.
- Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet*. 2011;12:529–41.
- Bock C. Epigenetic biomarker development. *Epigenomics*. 2009;1:99–110.
- Feinberg AP. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease. *Virchows Arch*. 2010;456:13–21.
- Verma M. Epigenome-Wide Association Studies (EWAS) in Cancer. *Curr Genomics*. 2012;13:308–13.

8. Shen J, Wang S, Zhang Y-J, Wu H-C, Kibriya MG, Jasmine F, et al. Exploring genome-wide DNA methylation profiles altered in hepatocellular carcinoma using Infinium HumanMethylation 450 BeadChips. *Epigenetics*. 2013;8:34–43.
9. Horvath S, Zhang Y, Langfelder P, Kahn RS, Boks MP, van Eijk K, et al. Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biol*. 2012;13:R97.
10. Johnson AA, Akman K, Calimport SRG, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhães JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res*. 2012;15:483–94.
11. Shenker NS, Ueland PM, Polidoro S, van Veldhoven K, Ricceri F, Brown R, et al. DNA methylation as a long-term biomarker of exposure to tobacco smoke. *Epidemiology*. 2013;24:712–6.
12. Flom JD, Ferris JS, Liao Y, Tehranifar P, Richards CB, Cho YH, et al. Prenatal smoke exposure and genomic DNA methylation in a multiethnic birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:2518–23.
13. Gupta R, Nagarajan A, Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *Biotechniques*. 2010;49:iii–xi.
14. Sham P, Bader JS, Craig I, O'Donovan M, Owen M. DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nat Rev Genet*. 2002;3:862–71.
15. Pearson JV, Huentelman MJ, Halperin RF, Tembe WD, Melquist S, Homer N, et al. Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide-polymorphism association studies. *Am J Hum Genet*. 2007;80:126–39.
16. Gaj P, Maryan N, Hennig EE, Ledwon JK, Paziewska A, Majewska A, et al. Pooled sample-based GWAS: a cost-effective alternative for identifying colorectal and prostate cancer risk variants in the Polish population. *PLoS One*. 2012;7:e35307.
17. Xu X, Su S, Barnes VA, De Miguel C, Pollock J, Ownby D, et al. A genome-wide methylation study on obesity: differential variability and differential methylation. *Epigenetics*. 2013;8:522–33.
18. Häslér R, Feng Z, Bäckdahl L, Spehlmann ME, Franke A, Teschendorff A, et al. A functional methylome map of ulcerative colitis. *Genome Res*. 2012;22:2130–7.
19. Docherty SJ, Davis OSP, Haworth CMA, Plomin R, Mill J. Bisulfite-based epityping on pooled genomic DNA provides an accurate estimate of average group DNA methylation. *Epigenetics Chromatin*. 2009;2:3.
20. Norton N, Williams NM, O'Donovan MC, Owen MJ. DNA pooling as a tool for large-scale association studies in complex traits. *Ann Med*. 2004;36:146–52.
21. Teumer A, Ernst FD, Wiechert A, Uhr K, Nauck M, Petersmann A, et al. Comparison of genotyping using pooled DNA samples (allelotyping) and individual genotyping using the affymetrix genome-wide human SNP array 6.0. *BMC Genomics*. 2013;14:506.
22. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014;30:1363–9.
23. Davis S, Du P, Bilke S, Triche T J and BM. methylumi: Handle Illumina methylation data. R Packag version 2100. 2014.
24. Du P, Kibbe WA, Lin SM. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*. 2008;24:1547–8.
25. Schalkwyk LC, Pidsley R, Wong CC, Touleimat wfcBn, Defrance M TA and MJ. watermelon: Illumina 450 methylation array normalization and metrics. R Packag version 140. 2013.
26. Price ME, Cotton AM, Lam LL, Farré P, Emberly E, Brown CJ, et al. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6:4.
27. Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 2012;4:325–41.
28. Pidsley R, Wong CC Y, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*. 2013;14:293.
29. Basic Functions for Power Analysis. [<http://cran.r-project.org/web/packages/pwr/pwr.pdf>].

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.2. ARTÍCULO 2

TRAF3 Epigenetic regulation is associated with vascular recurrence in patients with ischemic stroke.

Gallego-Fabrega C, Carrera C, Reny JL, Fontana P, Slowik A, Pera J, Pezzini A, Serrano-Heras G, Segura T, Martí-Fàbregas J, Muiño E, Cullell N, Montaner J, Krupinski J, Fernandez-Cadenas

I.

Stroke. 2016. 47(5):1180-6

TRAF3 Epigenetic Regulation Is Associated With Vascular Recurrence in Patients With Ischemic Stroke

Cristina Gallego-Fabrega, MSc; Caty Carrera, MD, MSc; Jean-Luc Reny, MD, PhD; Pierre Fontana, MD, PhD; Agnieszka Slowik, MD, PhD; Joanna Pera, MD, PhD; Alessandro Pezzini, MD; Gemma Serrano-Heras, PhD; Tomás Segura, MD, PhD; Joan Martí-Fàbregas, MD, PhD; Elena Muiño, MD; Natalia Cullell, MSc; Joan Montaner, MD, PhD; Jerzy Krupinski, MD, PhD; Israel Fernandez-Cadenas, PhD

Background and Purpose—Clopidogrel is one of the most used antiplatelet drugs in patients with cardiovascular disease. However, 16% to 50% of patients have a high on-clopidogrel platelet reactivity and an increased risk of ischemic events. The pathogenesis of high on-treatment platelet reactivity in patients with stroke is only partially explained by genetic variations. This study aims to find differentially methylated sites across the genome associated with vascular recurrence in ischemic stroke patients treated with clopidogrel.

Methods—From a cohort of 1900 patients with ischemic stroke, we selected 42 patients treated with clopidogrel, including 21 with a recurrent vascular event and 21 without vascular recurrence during the first year of follow-up. Over 480 000 DNA methylation sites were analyzed across the genome. Differentially methylated CpG sites were identified by nonparametric testing using R. Replication analysis was performed in a new cohort of 191 subjects and results were correlated with platelet reactivity in a subset of 90 subjects using light transmission aggregometry.

Results—A total of 73 differentially methylated CpG sites ($P < 1 \times 10^{-5}$) were identified; 3 of them were selected for further replication: cg03548645 ($P = 1.42 \times 10^{-5}$, *TRAF3*), cg09533145 ($P = 7.81 \times 10^{-6}$, *ADAMTS2*), and cg15107336 ($P = 1.89 \times 10^{-5}$, *XRCC1*). The cg03548645 CpG remained significant in the replication study ($P = 0.034$), a deep analysis of this region revealed another methylation site associated with vascular recurrence, $P = 0.037$. Lower cg03548645 (*TRAF3*) DNA methylation levels were correlated with an increased platelet aggregation ($\rho = -0.29$, $P = 0.0075$).

Conclusions—This study suggests for the first time that epigenetics may significantly contribute to the variability of clopidogrel response and recurrence of ischemic events in patients with stroke. (*Stroke*. 2016;47:1180-1186. DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.012237.)

Key Words: aspirin ■ clopidogrel ■ methylation ■ stroke ■ vascular resistance

Patients with Ischemic stroke are at high risk of having a new stroke or developing other vascular diseases such as acute myocardial infarction, or vascular death, known as vascular recurrence. A study in the South London Stroke Register described a cumulative risk of vascular recurrence after a first stroke of 8.0% at 1 year and 16.6% at 5 years.¹ To reduce vascular recurrence, the most prescribed treatment for secondary prevention of stroke is antiplatelet agents,² most widely used are acetylsalicylic acid, clopidogrel, or a combination of both.

However 10% to 20% of patients treated with antiplatelet drugs have a new vascular event³; in addition, serious vascular events are reduced only by <25% compared with placebo.⁴

Pharmacogenetic studies have evaluated the relationship between genetic variants and high on-treatment platelet reactivity usually assessing platelet aggregation.⁵ Mega et al⁵ found an association between the CYP2C19 reduced-function allele and lower levels of the clopidogrel active metabolite, diminished platelet inhibition, and higher rates of major

Received November 25, 2015; final revision received February 29, 2016; accepted March 1, 2016.

From the Neuroscience Department, Stroke Pharmacogenomics and Genetics, Fundació Docència i Recerca Mutua Terrassa, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa (Barcelona), Spain (C.G.-F., J.M.-F., E.M., N.C., I.F.-C.); School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain (C.G.-F.); Neurology Department, Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain (C.C., J.M.); Division of Internal Medicine, and Rehabilitation, Trois-Chêne Hospital, University Hospitals of Geneva, Switzerland (J.-L.R.); Geneva Platelet Group, Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland (J.-L.R., P.F.); Division of Angiology and Haemostasis, University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland (P.F.); Department of Neurology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland (A.S., J.P.); Department of Clinical and Experimental Science, Neurological Clinic, Università degli Studi di Brescia, Brescia, Italy (A.P.); Neurology Department, Albacete Hospital, Albacete, Spain (G.S.-H., T.S.); Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain (J.M.-F.); Neurology Service, Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa, (Barcelona), Spain (J.K.); and Neuroscience Department, School of Healthcare Science, Manchester Metropolitan University, Manchester, United Kingdom (J.K.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://stroke.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/STROKEAHA.115.012237/-/DC1>.

Correspondence to Israel Fernandez-Cadenas, PhD, Stroke Pharmacogenomics and Genetics, Fundació Docència i Recerca Mutua Terrassa, C/ Sant Antoni 19, 08221 Terrassa, Spain. E-mail israelcadenas@yahoo.es

© 2016 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.115.012237

adverse cardiovascular events. Shuldiner et al⁶ also found the CYP2C19*2 allele to be associated with diminished platelet response to clopidogrel treatment and poorer cardiovascular outcomes. Furthermore, Holmes et al⁷ found an association between the CYP2C19 genotype and clopidogrel responsiveness, although there was no significant association of genotype with cardiovascular events.

Pharmacogenetic studies have found single-nucleotide polymorphisms associated with platelet aggregation in clopidogrel-treated patients; however, they have failed to find a genetic predisposition associated with new vascular events. Therefore new approaches, such as epigenetic studies, may contribute to finding the underlying cause of the occurrence of new vascular events after clopidogrel treatment. Epigenetics refers to DNA modifications affecting gene expression and chromatin structure without altering the nucleotide sequence. Epigenetic modifications are stable, reversible, and heritable and can be modulated by many factors including physiological and pathological conditions and by the environment. Epigenetic processes are involved in numerous cellular processes, and also related to some monogenic and complex human diseases.⁸

Recent studies have observed epigenetic mechanisms involved in the pathogenesis of atherosclerosis.^{9,10} Su et al¹¹ observed that lower *P2Y12* gene promoter DNA methylation (DNAm) was associated with an increased risk of clopidogrel high on-treatment platelet reactivity in patients with albumin ≤ 35 g/L, currently smoking, or abusing alcohol, suggesting a potential role for epigenetics in clopidogrel high on-treatment platelet reactivity and vascular events after clopidogrel treatment.

The aim of this study is to analyze the whole epigenome of ischemic stroke patients treated with clopidogrel with an Epigenome-Wide Association Study (EWAS) to find altered methylation sites associated with new ischemic events (vascular recurrence) after first ischemic stroke.

Materials and Methods

Clinical Protocol

From a cohort of 1900 patients with stroke from Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain), 42 subjects were selected. First, 21 subjects with ischemic stroke, who were treated with clopidogrel after the first stroke and had a new vascular event (defined as new ischemic stroke, myocardial infarction, peripheral vascular disease, or cardiovascular death), were selected. The remaining 21 subjects were selectively matched one-by-one with the first 21 subjects (ischemic stroke patients treated with clopidogrel after the ischemic stroke event and without a new vascular event). Matching variables were age (± 7 years), sex, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)¹² classification, and clopidogrel administration (Table 1). Ethical committee approved the study (PR(AG) 03/2007). All patients were provided with oral and written information about the project, and signed the informed consent.

The study cases were defined as being patients with ischemic stroke who started clopidogrel treatment after stroke and who had a vascular recurrence in the first year of follow-up with a good adherence to the treatment as measured by the Morisky–Green test.¹³ Controls were defined as patients with ischemic stroke who started clopidogrel treatment after stroke with a good adherence to the treatment but without vascular recurrence during the first year of follow-up. Vascular recurrence was described as new ischemic stroke, myocardial infarction, peripheral vascular disease, or cardiovascular death and was detected through telephone calls every 3 months or direct clinical visit.

Replication analysis was performed on 191 new samples from 3 cohorts, 2 ischemic stroke patients' cohorts and 1 cardiovascular disease patients' cohort, for further information about sample selection and cohorts see Table I in the online-only Data Supplement. The replication cohort included 29 patients with cardiovascular disease (ischemic stroke and myocardial infarction) treated with clopidogrel with a new vascular event and 162 patients with cardiovascular disease treated with clopidogrel without a new vascular event during the first year of follow-up (Table 1).

DNA Preparation and Bisulfite Conversion

Total genomic DNA was extracted from whole blood samples obtained during the first 24 hours after stroke onset before clopidogrel initial administration using the Gentra Puregene Blood Kid (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.

Infinium HumanMethylation450 BeadChip Discovery Assay

Genome-wide DNAm was assessed using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina Inc, San Diego, CA). All samples were processed in a single working batch.

All preprocessing, correction, normalization steps, and plots were implemented using the R statistical computing environment (3.1.3 version) with Bioconductor packages (Table II in the online-only Data Supplement). Quality control metrics were examined to determine the success of the bisulfite conversion and subsequent array hybridization. Fluorescence intensities were imported from GenomeStudio, then probe filtering was performed to remove probes that have failed to hybridize (detection $P > 0.05$) and that are not represented by a minimum of 3 beads on the array, as described elsewhere.^{14,15} CpG sites containing documented single-nucleotide polymorphisms were also excluded.¹⁶ Multidimensional scaling plots were used to evaluate sex outliers based on chromosome X data. Multidimensional scaling and principal components were also used to check unknown population structures. Probes mapping to sex chromosomes were removed. We also checked the white cell count (neutrophils, lymphocytes, and monocytes) as a possible confounding factor. Finally, a subset quantile normalization was performed using a background adjustment between-array normalization and a dye bias correction, following previous recommendations.¹⁵

The methylation level of each cytosine was expressed as a β -value, which ranged between 0 and 1, unmethylated to completely methylated, respectively. Differentially methylated CpG (DMCs) sites were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney *U* test for independent samples, *P* values $< 10^{-6}$ were selected as statistically significant¹⁷ and *P* values $< 10^{-5}$ as nominal association. Multivariable generalized linear analyses adjusting for Principal Components and DNAm potential covariates (age, sex, and current smoking) were also used.

MassARRAY EpiTYPER, Replication Assay

Quantitative DNAm analysis was performed using the MassARRAY EpiTYPER (Sequenom, San Diego, CA) on 3 selected CpGs from the 450-k array discovery study. Selection criteria: have at least a nominal association with vascular recurrence ($P < 10^{-5}$), be in a region suitable for MassARRAY EpiTYPER analysis (not all CpGs could be analyzed), and map on a gene previously related to inflammatory processes or cardiovascular events in the literature (bibliographic research performed in PubMed [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed], using the keywords clopidogrel, atherosclerosis, ischemic and vascular). Target-specific primers were designed using the online software EpiDesigner [http://www.epidesigner.com], list of primers in the Table III in the online-only Data Supplement). The quantitative methylation data obtained for each CpG site, or aggregates of multiple CpG sites, were analyzed with the EpiTYPER software (Sequenom). Statistical analyses were performed using R (3.1.3 version). *P* values < 0.05 were considered as statistically significant, after the Mann–Whitney *U* test.

Table 1. Descriptive Characteristics of the Study Population

	Vascular Recurrence	Nonvascular Recurrence	Vascular Recurrence	Nonvascular Recurrence
	Discovery cohort (n=42)		Replication cohort (n=191)	
n	21 (50%)	21 (50%)	29 (15%)	162 (85%)
Age, y	70.25±8.7	71.68±8.3	69±10	66±10
Male	18 (85.7%)	18 (85.7%)	16 (55.2%)	140 (86.8%)
Female	3 (14.3%)	3 (14.3%)	13 (44.9%)	42 (26%)
TOAST				
Atherothrombotic	11 (52.4%)	11 (52.4.2%)	3 (10.4%)	21 (13%)
Lacunar	5 (23.8%)	5 (23.8%)	1 (3.5%)	10 (6.2%)
Undetermined	4 (19%)	4 (19%)	3 (10.4%)	35 (21.7%)
Other	1 (4.8%)	1 (4.8%)	13 (44.9%)	12 (7.4%)
Presence of dyslipidemia	12 (57.1%)	8 (38.1%)	5 (17.3%)	52 (32.2%)
Presence of diabetes mellitus	8 (38.1%)	8 (38.1%)	6 (20.4%)	33 (20.5%)
Presence of hypertension	13 (29.9%)	17 (39.1%)	22 (75.9%)	102 (63.2%)
Current smoker	15 (71.4%)	18 (85.7%)	3 (10.4%)	23 (14.3%)
Alcohol	11 (52.4%)	19 (90.4%)
Previous myocardial infarction	2 (9.5%)	1 (4.76%)	4 (13.8%)	98 (60.8%)
Previous coronary intervention	5 (17.3%)	28 (17.4%)
Previous angina	2 (9.5%)	...	2 (6.9%)	8 (5%)
Previous tumor	2 (9.5%)	1 (4.76%)	5 (17.3%)	5 (3.1%)
Statin	11 (52.4%)	14 (66.6%)	13 (44.9%)	88 (54.6%)
Atrovastatine	8 (38.1%)	7 (33.3%)	3 (10.4%)	35 (21.7%)
Provastatine	1 (3.45%)	17 (10.5%)
Rosuvastatine	13 (8.1%)
Sinvastatine	3 (14.3%)	4 (19%)	4 (2.1%)	8 (5%)
Unknown	...	3 (14.3%)	5 (17.3%)	13 (8.1%)

Discovery cohort n=42, replication cohort n=191. TOAST indicates Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment.

CYP2C19*2 Analysis

We checked the CYP2C19*2 polymorphism (rs4244285) that has been strongly associated with clopidogrel responsiveness^{6,7} to know whether it could be a confounding factor in the EWAS analysis (complete Methods in the online-only Data Supplement).

Platelet Aggregation Assay

Spearman rank correlation was used to estimate the correlation between methylation levels of replicated CpGs and platelet aggregation. Values from a subgroup of 90 subjects from the replication study were used. Platelet aggregation values were obtained using Light Transmission Aggregometry with ADP as the agonist at a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$.¹⁸

TRAF3 in Aspirin-Treated Patients

A group of patients with stroke treated only with aspirin (n=38) were selected from the Vall d'Hebron University Hospital's cohort following the same inclusion and exclusion criteria used for clopidogrel-treated patients. Of these, 19 patients presented a new vascular event during the first year of follow-up and 19 patients, matched for age, sex, and TOAST, did not present a vascular recurrence. Methylation levels of 37 CpGs located in tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (*TRAF3*) gene were analyzed in this group. See online-only Data Supplement.

Statistical Analysis

A sample size of 21 subjects per condition was needed to achieve a 10^{-05} significance level and 80% statistical power, considering a Cohen effect size=1.8. Sample size calculation was performed using the pwr package (version: 1.1-2) from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

Continuous variables were compared using the Mann-Whitney *U* test, multivariable generalized linear analysis, or Spearman correlation test for nonparametric samples, using the R software (<http://www.cran.r-project.org>).

Results

Epigenome-Wide Analysis

Epigenome-wide analysis of the 485577 CpG sites was assessed using the Illumina 450-k BeadChip across the whole genome in each of the 42 individual samples. After preprocessing and QC analysis, 34059 CpG sites and 1 sample were removed from further analysis: 1848 CpGs with detection *P* >0.05, 20935 CpGs that overlap with single-nucleotide polymorphisms, and 11276 CpGs located on sexual chromosomes, and 1 sample with sex discrepancies.

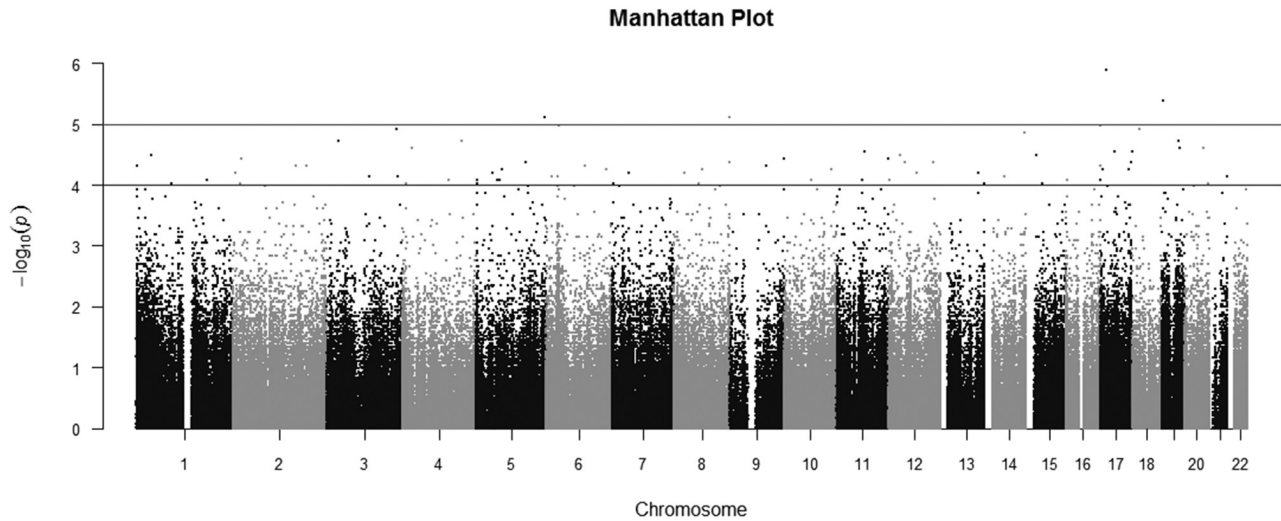


Figure 1. Epigenome-wide association between vascular recurrence patients and nonvascular recurrence patients of 451 518 CpGs. Seventy-three CpGs reached statistical significance, trend ($P < 10^{-5}$), represented by the horizontal line. x-axis indicates chromosome position, and y-axis indicates $-\log_{10}$ of P values for each CpG site.

The methylation intensities showed bimodal distribution when displayed across all probes (Figure IA in the online-only Data Supplement), but approximately normal distribution for most CpGs when they were considered individually (Figure IB in the online-only Data Supplement). The $-\log_{10}$ (P value) values from DMCs site analysis were plotted for 451 518 CpGs across the genome (Figure 1). Seventy-three candidate DMCs were associated with vascular recurrence in stroke patients treated with clopidogrel with nominal associations P values ($P < 10^{-05}$; Table 2).¹⁷ Figure 2 shows a hierarchical cluster analysis for a panel of the top 73 significant DMC sites ($P < 10^{-05}$), this is able to distinguish vascular recurrence

patients from nonvascular patients (with only 1 sample misclassified). A heatmap of the 73 DMCs is shown in the Figure II in the online-only Data Supplement. Among the 73 DMCs, 48 had higher and 25 had lower DNAm levels in patients with a recurrent vascular event compared with patients with non-recurrence (Figure III in the online-only Data Supplement).

Replication Analysis

The replication analysis of 3 CpG sites was performed for 191 new samples by MassARRAY EpiTyper. The selected CpGs mapped to 3 genes known to be involved in atherosclerosis and vascular processes and could be analyzed by MassARRAY

Table 2. Differentially Methylated CpG (DMC) Sites Associated With Vascular Recurrence in Patients With Stroke Treated With Clopidogrel

CpG ID	Chr	Position	Gene	Mapping to Gene	P Value
cg06726262	17	15602873	<i>ZNF286A</i>	TSS200	1.29E-06
cg09332091	19	3180708			4.18E-06
cg09533145	5*	178563145*	<i>ADAMTS2*</i>	Body*	7.81E-06*
cg18002896	8	144465845	<i>RHPN1</i>	3'UTR	7.81E-06
cg07925064	16	90114301	<i>LOC100130015</i>	TSS200; TSS1500	1.06E-05
cg14630099	6	32975702	<i>HLA-DOA</i>	Body	1.06E-05
cg01348374	3	181313591			1.23E-05
ch,18,400468R	18	20395250			1.23E-05
cg03548645	14*	103369816	<i>TRAF3*</i>	Body*	1.42E-05*
cg10318528	4	154702461	<i>SFRP2</i>	3'UTR	1.89E-05
cg15107336	19*	44079778*	<i>XRCC1*</i>	TSS200*	1.89E-05*
cg27093242	3	32927448	<i>TRIM71</i>	Body	1.89E-05
cg16126516	19	46850186	<i>PPP5C</i>	TSS200	2.51E-05
cg18997433	4	24585879	<i>DHX15</i>	Body	2.51E-05
cg22849543	20	46997755	<i>LOC284749</i>	Body	2.51E-05

Top 15 most significant CpGs ($P < 10^{-5}$), see Table V in the online-only Data Supplement for full 73 DMCs.

*Selected CpGs for replications.

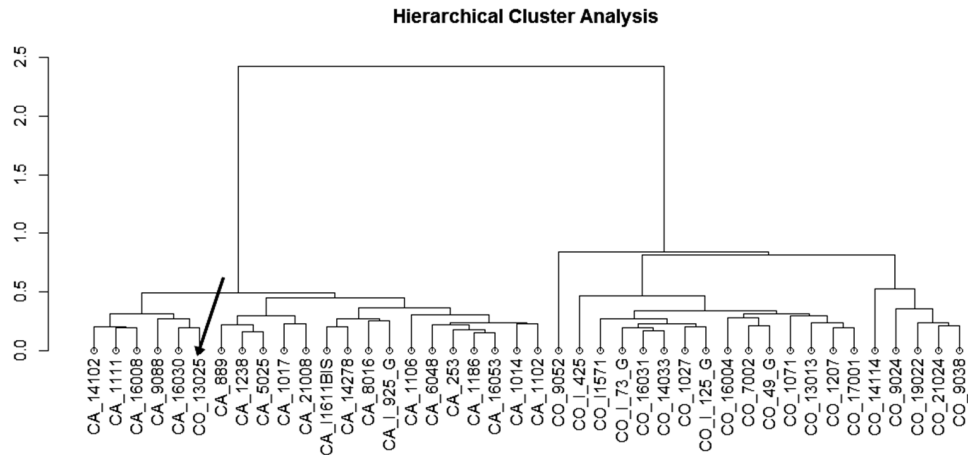


Figure 2. Hierarchical cluster analysis of most significant DMC associated with vascular recurrence in clopidogrel patients. Notice the nearly perfect segregation between the vascular recurrence samples (CA) and the nonvascular recurrence samples (CO).

EpiTyper (*ADAMTS2* cg09533145, $P=7.81 \times 10^{-6}$; *XRCC1* cg15107336, $P=1.89 \times 10^{-5}$; and *TRAF3* cg03548645, $P=1.42 \times 10^{-5}$). Three 400-pb regions containing each one of the 3 selected CpG sites, including other CpG sites and aggregates, were sequenced. For all analyzed regions, the averaged directions of methylation changes were consistent with the methylation changes observed in the 450-k BeadChip array.

The CpG site mapped to *TRAF3* gene cg03548645 was associated with vascular recurrence ($P=0.034$), in the replication cohort. In addition, 3 new aggregated CpGs were associated with vascular recurrence de novo (Table 3). The cg03548645 CpG site was independently analyzed for each individual cohort from the validation stage (Spanish, $P=0.83$; Italian, $P=0.2$; and Swiss, $P=0.15$) and showed the same methylation pattern in each one of them (Figure IV in the online-only Data Supplement). Lower methylation levels were associated with vascular recurrence. These results were consistent with the ones observed when we analyzed the 3 cohorts together, which reaches statistical significance because of the increased statistical power as a result of the larger sample size.

Cardiovascular risk factors (age, sex, and current smoking) were analyzed as possible confounding factors in the discovery cohort, *TRAF3* was independently associated with vascular recurrence ($P=1.33 \times 10^{-3}$). In addition, *TRAF3* methylation levels were not influenced by cell-type proportions. When excluding patients with previous tumors, as possible confounding factor because of an increased activation of the inflammation pathway, *TRAF3* was still associated with vascular recurrence ($P<3.33 \times 10^{-5}$). The frequency distribution of the *CYP2C19*2* (rs4244285) polymorphism,

previously associated with clopidogrel responsiveness,^{6,7} was also checked. The risk allele was equally distributed between patients ($n=5$) and controls ($n=5$), $P=0.87$. We also checked the methylated status of 5 CpGs of *CYP2C19* gene, none of them presented statistically significant results (Table IV in the online-only Data Supplement).

In addition, an inverse statistically significant correlation ($\rho=-0.29$, $P=0.0075$) was observed between DNAm levels (cg03548645 and *TRAF3*) and platelet aggregation (Figure 3), indicating that *TRAF3* methylation was associated with a biochemical resistance to clopidogrel activity. Moreover, we observed that the methylation differences in cg03548645 were not stroke subtype dependent because we observed the same differences between recurrent and non-recurrent stroke patients within the group of atherothrombotic strokes ($P=0.011$), and between the group of patients with nonatherothrombotic stroke ($P=0.007$; Figure V in the online-only Data Supplement). When the 37 CpG sites of *TRAF3* were assessed in aspirin-treated patients, no association was found between cg03548645 and vascular recurrence ($P=0.48$). However, *TRAF3* cg03548645 methylation was lower in patients with vascular recurrence. Importantly, a different CpG site was associated with vascular recurrence (cg14008679, $P=5.41 \times 10^{-4}$). Patients treated with aspirin showed the same methylation pattern that clopidogrel-treated patients for these 2 CpG sites, with lower *TRAF3* methylation levels associated with vascular recurrence (Figure VI in the online-only Data Supplement).

Discussion

We performed the first genome-wide DNAm profiling of vascular recurrence in clopidogrel-treated patients with stroke. High-throughput DNAm array-based profiling covering >450 000 CpG sites of the human genome was complemented by MassArray replication of the most physiopathologically relevant results. Quantitative DNAm identified DMCs sites mapped to atherosclerosis and vascular process-related genes.

The EWAS revealed 73 DMCs associated with vascular recurrence in clopidogrel-treated stroke patients. After EpiTYPET analysis, the association with the cg03548645,

Table 3. Differentially Methylated CpG Sites Identified De Novo, and the One Replicated in the MassARRAY Replication Study

CpG ID	Identification	Chr	Gene	P Value
TRAF3_1,2	Replicated	14	<i>TRAF3</i>	0.03441
TRAF3_6,7,8	De novo	14	<i>TRAF3</i>	0.04089
XRCC1_19,20	De novo	19	<i>XRCC1</i>	0.04195
XRCC1_36	De novo	19	<i>XRCC1</i>	0.04261

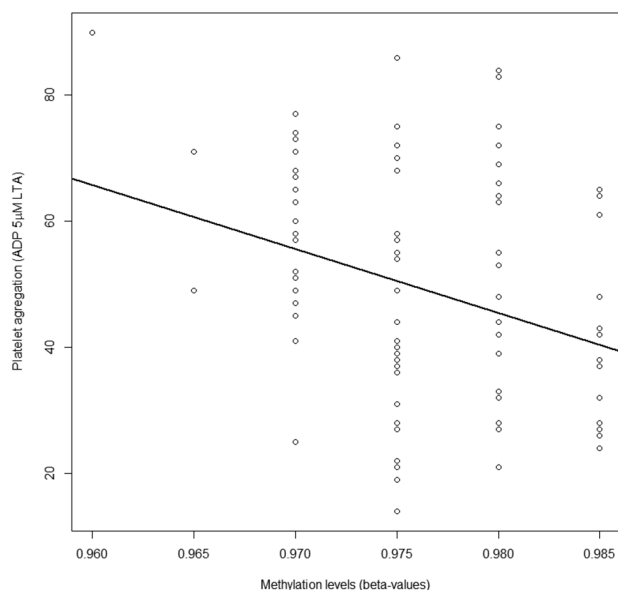


Figure 3. Correlation between cg03548645 DNAm values and platelet aggregation ($\rho=-0.29$, $P=0.0075$). x-axis indicates β -values for CpG 1.2 from EpiTYPER analysis, and y-axis indicates ADP 5 $\mu\text{mol/L}$ aggregation percentage by light transmission aggregometry (LTA).

mapping to *TRAF3*, was replicated. The results of the validation stage were not affected by the heterogeneity of the sample. There were no differences between patients with ischemic stroke and patients with cardiovascular disease. Furthermore, the methylation pattern of the *TRAF3* was similar in the 3 cohorts tested, being consistently lower in the patients with vascular recurrence. The combined analysis of the 3 cohorts reached sufficient statistical power to detect significant associations.

As further support of our findings, cg03548645 platelet aggregation levels were correlated with the DNAm levels. The differences between cases and controls were independent of stroke subtype. Furthermore, the CYP2C19*2 polymorphism was not a confounding factor because it was equally distributed between our groups ($P=0.872$). Furthermore, CYP2C19 was not differentially methylated between recurrent and nonrecurrent patients.

The *TRAF3* encodes a protein member of the TRAF family. These proteins participate in the signal transduction of CD40 and tumor necrosis factor receptor, important to immune response activation. It has been shown that patients having cardiovascular disease exhibit increased levels of circulating and soluble CD40 ligand (DC40L).^{19,20} Song et al²¹ described association between *TRAF3* gene expression and CD40 levels in arterial injury, also Pluvinet et al²² highlight the anti-inflammatory potential of RNAi-mediated CD40 inhibition, and the relevance of CD40 signaling for therapeutic intervention. del Río-Espínola et al²³ also found an association between CD40 polymorphisms and reocclusion risk after fibrinolysis during the acute phase of ischemic stroke.

Zirlik et al²⁴ investigated *TRAF* expression in murine and human atherosclerotic plaques. They found increased expression levels of TRAF2 and TRAF3 protein in atherosclerotic tissues compared with nondiseased tissue. The results also

establish the functional relevance of these *TRAF* families for proinflammatory signaling events in endothelial cells, and hence in inflammatory vascular diseases such as atherosclerosis. A recent study has also found *TRAF3* upregulation associated with hypertrophied mice hearts and failing human hearts. Transgenic mice overexpressing *TRAF3* in the heart developed exaggerated cardiac hypertrophy.²⁵

Our results indicate significantly lower DNAm levels of CpG cg03548645 in patients who had vascular recurrence during clopidogrel treatment, compared with those who did not have vascular recurrence during the first year of follow-up. These results were not influenced by common cardiovascular risk factors ($P=1.33\times 10^{-03}$) or previous presence of tumors ($P=3.33\times 10^{-05}$). A replication study was conducted on randomly selected samples from 3 international cohorts. cg03548645 remained significantly associated ($P=0.034$) and a new CpG aggregate, located ≈ 150 -bp downstream from the main site, was also significantly associated with vascular recurrence ($P=0.040$). All results were consistent in the discovery and the replication study; in both studies, recurrent patients show lower methylation levels than nonrecurrent patients. When cg03548645 DNAm levels were analyzed on aspirin-treated patients, no association with vascular recurrence was found. However, lower cg03548645 methylation levels were observed in vascular recurrent patients, this trend was the same observed in clopidogrel-treated patients. In addition, a second *TRAF3* CpG site (cg14008679) was found associated with vascular recurrence during aspirin treatment, with recurrent patients showing lower methylation levels in comparison with nonrecurrent patients. We hypothesize that *TRAF3* lower methylation may be directly related to vascular recurrence regardless aspirin or clopidogrel administration. However, the sample size for aspirin-treated patients is too small to validate this hypothesis. This hypothesis should be further investigated in future studies with patients on other antiplatelet or anticoagulants drugs.

The cg03548645 CpG is located in the *TRAF3* gene body. Lower DNAm levels in gene bodies have been associated with higher levels of gene expression.²⁶ Therefore, we hypothesize that *TRAF3* expression may be higher in the vascular recurrence patients, which might increase the CD40 ligand signal transduction, thereby enhancing platelet–platelet interactions, secretion, and thrombus growth under arterogenic conditions.²⁷

In addition to the association with vascular recurrence in on-clopidogrel treatment patients, we also found that lower cg03548645 DNAm levels were correlated with higher platelet aggregation (ADP-induced platelet aggregation; $P=0.0075$). This association indicates that epigenetics might be involved in the vascular recurrence of stroke and in the pharmacodynamics of clopidogrel. Further studies will be needed to discern if the *TRAF3* (cg03548645) association with vascular recurrence in stroke is because of an increased risk of atherosclerosis, to the inhibition of clopidogrel activity or to a combination of both processes.

The next steps will include the analyses of *TRAF3* transcriptional levels in patients treated with clopidogrel and, it could also be interesting to study these findings in animal models to determine the role of TRAF3 and the reason of the association

with vascular recurrence. Prospective studies analyzing the methylation levels previous to secondary prevention treatment and post recurrence will also be helpful to determine whether *TRAF3* methylation levels can act as a predictive tool in the clinical practice. In summary, the measurement of methylation levels could be, in the future, useful to predict a higher risk of recurrent stroke in patients treated with clopidogrel and to pave the way for an improved personalized management.

Limitations

Analysis of mRNA expression levels was not possible in our study cohorts. Further analysis are needed to confirm the biological meaning of the results. Sample size of discovery phase (clopidogrel and aspirin) was relatively small, although the study had enough statistical power to reach epigenome-wide significance.

Acknowledgments

The Laboratory of Stroke Pharmacogenomics and Genetics is part of the International Stroke Genetics Consortium and coordinates the Spanish Stroke Genetics Consortium.

Sources of Funding

This study was funded by the Miguel Servet grant (CP12/03298), by Instituto de Salud Carlos III and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (ISCIII-FEDER). Joanna Pera is supported by the JUMC No. K/ZDS/003844 grant.

Disclosures

None.

References

- Hillen T, Coshall C, Tilling K, Rudd AG, McGovern R, Wolfe CD; South London Stroke Register. Cause of stroke recurrence is multifactorial: patterns, risk factors, and outcomes of stroke recurrence in the South London Stroke Register. *Stroke*. 2003;34:1457–1463. doi: 10.1161/01.STR.0000072985.24967.7F.
- Born G, Patrono C. Antiplatelet drugs. *Br J Pharmacol*. 2006;147(suppl 1):S241–S251. doi: 10.1038/sj.bjp.0706401.
- Greer DM. Aspirin and antiplatelet agent resistance: implications for prevention of secondary stroke. *CNS Drugs*. 2010;24:1027–1040. doi: 10.2165/11539160-000000000-00000.
- Weber R, Diener HC. Controversies and future perspectives of antiplatelet therapy in secondary stroke prevention. *J Cell Mol Med*. 2010;14:2371–2380. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01162.x.
- 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;360:354–362. doi: 10.1056/NEJMoa0809171.
- 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;302:849–857. doi: 10.1001/jama.2009.1232.
- Holmes MV, Perel P, Shah T, Hingorani AD, Casas JP. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011;306:2704–2714. doi: 10.1001/jama.2011.1880.
- Feinberg AP. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease. *Virchows Arch*. 2010;456:13–21. doi: 10.1007/s00428-009-0847-2.
- Zhang BK, Lai X, Jia SJ. Epigenetics in atherosclerosis: a clinical perspective. *Discov Med*. 2015;19:73–80.
- Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, Condom E, et al. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7:692–700. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000441.
- Su J, Li X, Yu Q, Liu Y, Wang Y, Song H, et al. Association of P2Y12 gene promoter DNA methylation with the risk of clopidogrel resistance in coronary artery disease patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:450814. doi: 10.1155/2014/450814.
- Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35–41.
- Morisky DE, Green LW, Levine DM. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence. *Med Care*. 1986;24:67–74.
- Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium® Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 2012;4:325–341. doi: 10.2217/epi.12.21.
- Pidsley R, Y Wong CC, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*. 2013;14:293. doi: 10.1186/1471-2164-14-293.
- Price ME, Cotton AM, Lam LL, Farré P, Emberly E, Brown CJ, et al. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6:4. doi: 10.1186/1756-8935-6-4.
- Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet*. 2011;12:529–541. doi: 10.1038/nrg3000.
- Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Miranda M, Romano E, Gori AM, et al. Light transmittance aggregometry induced by different concentrations of adenosine diphosphate to monitor clopidogrel therapy: a methodological study. *Ther Drug Monit*. 2011;33:94–98. doi: 10.1097/FTD.0b013e3182052ff4.
- Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:669–677. doi: 10.1016/j.jacc.2009.03.076.
- Hassan GS, Merhi Y, Mourad W. CD40 ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases. *Immunobiology*. 2012;217:521–532. doi: 10.1016/j.imbio.2011.03.010.
- Song Z, Jin R, Yu S, Rivet JJ, Smyth SS, Nanda A, et al. CD40 is essential in the upregulation of TRAF proteins and NF-kappaB-dependent proinflammatory gene expression after arterial injury. *PLoS One*. 2011;6:e23239. doi: 10.1371/journal.pone.0023239.
- Pluvinet R, Olivari R, Krupinski J, Herrero-Fresneda I, Luque A, Torras J, et al. CD40: an upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by RNAi-coupled transcriptional profiling. *Blood*. 2008;112:3624–3637. doi: 10.1182/blood-2008-03-143305.
- del Río-Espínola A, Fernández-Cadenas I, Rubiera M, Quintana M, Domingues-Montanari S, Mendióroz M, et al. CD40 -1C>T polymorphism (rs1883832) is associated with brain vessel reocclusion after fibrinolysis in ischemic stroke. *Pharmacogenomics*. 2010;11:763–772.
- Zirlik A, Bavendiek U, Libby P, MacFarlane L, Gerdes N, Jagielska J, et al. TRAF-1, -2, -3, -5, and -6 are induced in atherosclerotic plaques and differentially mediate proinflammatory functions of CD40L in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1101–1107. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.140566.
- Jiang X, Deng KQ, Luo Y, Jiang DS, Gao L, Zhang XF, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a positive regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2015;66:356–367. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05469.
- Jjingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV, Jordan IK. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget*. 2012;3:462–474. doi: 10.18632/oncotarget.497.
- Kuijpers MJ, Mattheij NJ, Cipolla L, van Geffen JP, Lawrence T, Donners MM, et al. Platelet CD40L modulates thrombus growth via phosphatidylinositol 3-kinase β , and not via CD40 and I κ B kinase α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:1374–1381. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.305127.

***TRAF3* Epigenetic Regulation Is Associated With Vascular Recurrence in Patients With Ischemic Stroke**

Cristina Gallego-Fabrega, Caty Carrera, Jean-Luc Reny, Pierre Fontana, Agnieszka Slowik, Joanna Pera, Alessandro Pezzini, Gemma Serrano-Heras, Tomás Segura, Joan Martí-Fàbregas, Elena Muiño, Natalia Cullell, Joan Montaner, Jerzy Krupinski and Israel Fernandez-Cadenas

Stroke. 2016;47:1180-1186; originally published online March 29, 2016;

doi: 10.1161/STROKEAHA.115.012237

Stroke is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0039-2499. Online ISSN: 1524-4628

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://stroke.ahajournals.org/content/47/5/1180>

Data Supplement (unedited) at:

<http://stroke.ahajournals.org/content/suppl/2016/03/29/STROKEAHA.115.012237.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Stroke* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Stroke* is online at:
<http://stroke.ahajournals.org/subscriptions/>

Supplemental Data

Supplemental methods.

CYP2C19*2 analysis:

OmniQuadHuman 1M (Illumina). was used to genotype the samples. Data was analyzed following WTCC recommendation and the specific methodological guidelines from the Broad Institute and Harvard University. Quality controls (QC) were performed before the analyses.: Missings (-0.3) and checksex QCs were performed for each individual. Only individuals with Caucasian ethnicity were included. We also tested for population stratifications by analyzing the individual IBS, performing MDS plots and adjusting for principal components (PCs). Hardy-Weinberg ($p\text{-value} > 10^{-08}$), missingness (0.01), Mishap ($p\text{-value} > 10^{-09}$), were analyzed for each SNP.

After QC process, the genotypic results were analyzed by Plink, Haploview, STATA, SNPtest and GTOOL software solutions.

Replication cohorts

The Italian and Spanish cohorts consist of consecutively recruited patients that started clopidogrel treatment after the first ischemic stroke. Vascular recurrence information was available from all patients.

The Geneva cohort consists of consecutively recruited patients with symptomatic documented ischemic atherothrombotic disease (coronary artery disease [CAD], ischemic cerebrovascular disease and/or peripheral artery disease) treated with aspirin and/or clopidogrel for < 5 years. Information about clinical ischemic events over an ongoing 3-years follow-up was available from all patients. Only clopidogrel treated patients were selected from this cohort.

All samples with enough DNA concentration for Sequenom EpiTYPER analysis available, were selected from each cohort (Supplemental Table I).

TRAF3 in aspirin treated patients assay:

Thirty eight subjects from a cohort of 1.900 ischemic stroke patients recruited prospectively at Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain), who started aspirin treatment after the first ischemic stroke were analyzed. Nineteen participants presented a new vascular event during the first year of follow up, and were matched one-to-one with 19 participants without a new vascular event. Ethical approval was obtained from the ethical

committee of the Vall d'Hebron Hospital (PR(AG) 03/2007). Each participant signed the informed consent for the study.

Total genomic DNA was extracted from whole blood samples using Genra Puregen Blood Kid (Quiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Samples were obtained during the first 24h after stroke onset, before aspirin initial administration. Quality control (QC) of all samples was performed to check the DNA integrity before bisulfite conversion.

Genome-wide DNA methylation was assessed using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina Inc., San Diego Ca) that analyze methylation levels of 485.577 CpGs sites. All samples were processed in a single working batch. All pre-processing, correction and normalization steps as well as plots, were implemented using the computing environment R (3.1.3 version) with Bioconductor packages. QC and pre-processing steps were the same as described in the main manuscript for the clopidogrel analysis. Differentially methylated CpG sites (DMC) between vascular recurrent patients and non vascular recurrent patients were analyzed using the non parametric Mann-Whitney U-test for independent samples, only in 37 CpG sites located in the *TRAF3* genes.

Supplemental Table I: Descriptive characteristics of the 3 replication cohorts.

	Switzerland's Cohort		Italy's Cohort		Spain's Cohort	
	Rec	Non-Rec	Rec	Non-Rec	Rec	Non-Rec
N	8 (8.9%)	82 (91%)	17 (19%)	72 (80.6%)	4 (33.4%)	8 (66.6%)
Age (years)	68±10	71±11	70±12	68±14	69±7	65±8
Male	6 (75%)	69 (84.2%)	7 (41.2%)	45 (62.1%)	3 (75%)	6 (75%)
Female	2 (25%)	13 (15.9%)	10 (58.8%)	27 (37.3%)	1 (25%)	2 (25%)
Presence Dyslipidemia	4 (50%)	50 (61%)	-	-	1 (25%)	2 (25%)
Presence Diabetes Mellitus	2 (25%)	20 (%)	3 (17.6%)	9 (12.4%)	0	4 (50%)
Presence Hypertension	7 (87.5%)	54 (24.4%)	11 (64.7%)	44 (60.72%)	4 (100%)	4 (50%)
Current Smoker	1 (12.5%)	22 (26.8%)	2 (11.8%)	-	0	1 (12.5%)
TOAST						
Atherothrombotic			3 (17.6%)	18 (24.4%)	0	3 (37.5%)
Lacunar			1 (5.9%)	8 (11%)	0	2 (50%)
Undetermined			1 (5.9%)	35 (48.3%)	3 (75%)	0
Other			12 (70.6%)	11 (15.2%)	1 (25%)	1 (12.5%)
Previous Myocardial Infarction	1 (12.5%)	23 (28.1%)	3 (17.6%)	25 34.7(%)	-	-
Previous Coronary Intervention	4 (50%)	28 (34.2%)	-	-	1 (25%)	-
Previous Angina	-	8 (9.8%)	1 (5.9%)	-	1 (25%)	-
Previous Tumor	-	-	4 (23.52%)	5 (6.9%)	1 (25%)	-
Statin	6 (75%)	71 (86.6%)	3 (17.6%)	11 (15.2%)	4 (100%)	6 (75%)
Atrovastatine	3 (37.5%)	35 (42.7%)	-	-	-	-
Provastatine	1 (12.5%)	17 (20.7%)	-	-	-	-
Rosuvastatine	-	13 (15.9%)	-	-	-	-
Sinvastatine	2 (25%)	8 (9.8%)	-	-	2 (50%)	-
Unknown	-	2 (2.4%)	3 (17.6%)	11 (15.2%)	2 (50%)	-

Supplemental Table II: Bioconductor packages for the processing and analysis of array-based DNAm data.

DNAm processing/analysis step	Bioconductor packages
Methylation data loading	Methylumi
Quality control sample/probe	wateRmelon, minfi
Normalization and background correction	wateRmelon

Supplemental Table III: Sequences of primers used in MassARRAY EpiTYPER replication study.

Gene	Primer*	Size	Sequence	Product Size	N° of CpGs	Coverage
<i>TRAF3</i>	LP	25	GGTTAGTAGTGTGTATTTGGGTTT	327	12	9
	RP	25	ACCAACAAATCCTAACCTCTACCAT			
<i>XRCC1</i>	LP	25	GTTTGGTTAGAAGGATGAGGTAGAG	476	37	26
	RP	25	TCCATCCTAAATAAAAAACAAAACC			
<i>ADAMTS2</i>	LP	25	GGAGTTTTGATGGTTTTTTTATGTG	408	13	11
	RP	25	CCTCAACCTCCCAAATATCTAAAAT			

* LP, Left Primer; RP, Right Primer.

Supplemental Table IV: Differentially methylated analysis of the 5 CpG sites located in *CYP2C19* gene, present in the Illumina BeadChip array.

CpG ID	Chr	Position	Gene	p-value
cg00051662	10	96521086	<i>CYP2C19</i>	0,672
cg04189838	10	96523347	<i>CYP2C19</i>	0,901
cg18564458	10	96522433	<i>CYP2C19</i>	0,901
cg20031717	10	96523248	<i>CYP2C19</i>	0,126
cg24857560	10	96521152	<i>CYP2C19</i>	0,369

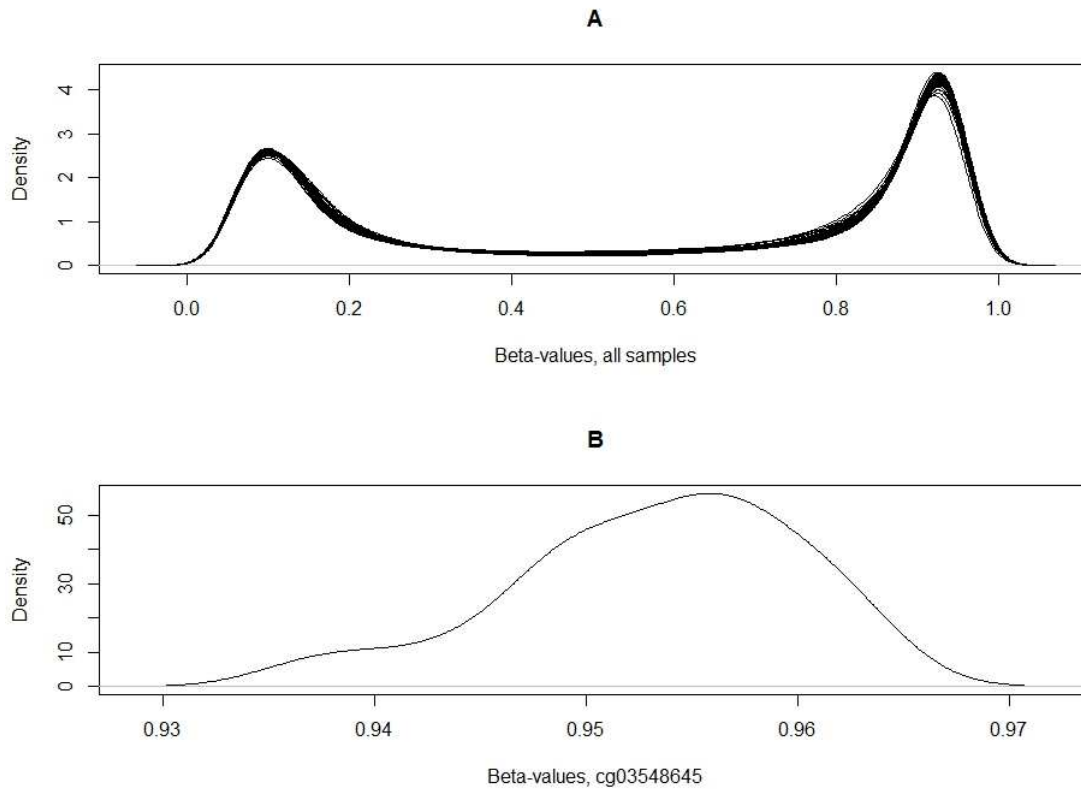
Supplemental Table V: Top 73 differentially methylated CpG sites (p -value $<10^{-5}$), associated with vascular recurrence in stroke patients treated with clopidogrel.

CpG ID	Chr	Position	Gene	Mapping to gene	p-value
cg06726262	17	15602873	<i>ZNF286A</i>	TSS200	1,29E-06
cg09332091	19	3180708			4,18E-06
cg09533145	5	178563145	<i>ADAMTS2</i>	Body	7,81E-06
cg18002896	8	144465845	<i>RHPN1</i>	3'UTR	7,81E-06
cg07925064	16	90114301	<i>LOC100130015</i>	TSS200; TSS1500	1,06E-05
cg14630099	6	32975702	<i>HLA-DOA</i>	Body	1,06E-05
cg01348374	3	181313591			1,23E-05
ch,18,400468R	18	20395250			1,23E-05
cg03548645	14	103369816	<i>TRAF3</i>	Body	1,42E-05
cg10318528	4	154702461	<i>SFRP2</i>	3'UTR	1,89E-05
cg15107336	19	44079778	<i>XRCC1</i>	TSS200	1,89E-05
cg27093242	3	32927448	<i>TRIM71</i>	Body	1,89E-05
cg16126516	19	46850186	<i>PPP5C</i>	TSS200	2,51E-05

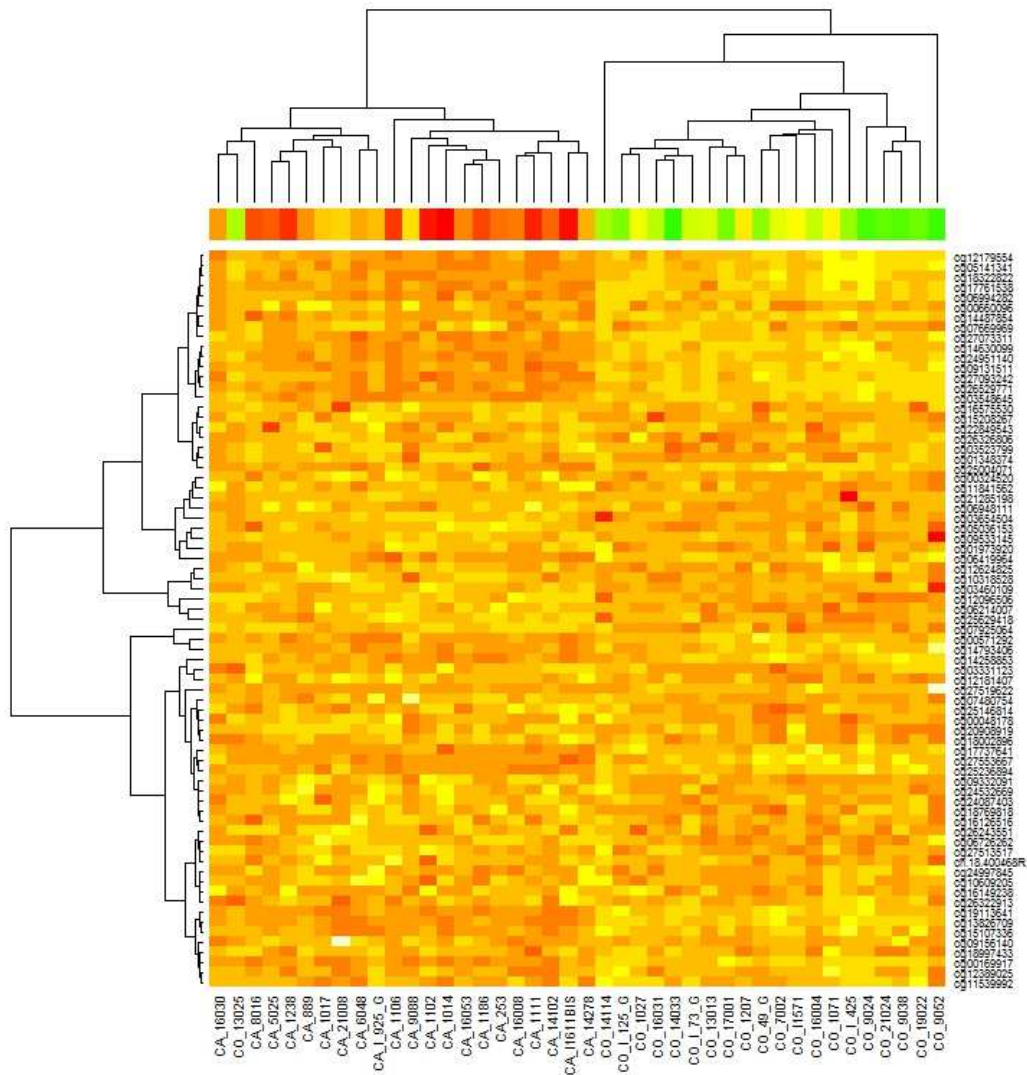
cg18997433	4	24585879	<i>DHX15</i>	Body	2,51E-05
cg22849543	20	46997755	<i>LOC284749</i>	Body	2,51E-05
cg00660096	17	81023323			2,88E-05
cg06419964	17	34965294	<i>MRM1</i>	3'UTR	2,88E-05
cg18769818	11	72433059	<i>ARAP1</i>	5'UTR; 1stExon; Body	2,88E-05
cg03654504	1	37495105	<i>GRIK3</i>	Body	3,31E-05
cg14258853	12	29935411	<i>TMTC1</i>	5'UTR	3,31E-05
cg27553667	15	27216083	<i>GABRG3</i>	TSS1500	3,31E-05
cg05036153	9	140128254	<i>SLC34A3</i>	Body	3,79E-05
cg12096506	11	134341284			3,79E-05
cg16149238	2	23608001	<i>KLHL29</i>	TSS1500	3,79E-05
cg11841562	5	128320387	<i>SLC27A6</i>	Body	4,33E-05
cg14793406	12	115135906			4,33E-05
cg17761538	8	145753477	<i>MGC70857</i> ; <i>LRRC24</i>	Body; TSS1500	4,33E-05
cg20908919	12	42877995	<i>PRICKLE1</i>	5'UTR; TSS200; TSS1500	4,33E-05
cg25146814	17	78977970			4,33E-05
cg07480754	16	88298508			4,94E-05
cg09131511	2	163089214	<i>FAP</i>	Body	4,94E-05
cg12624825	9	94895189	<i>LOC100128076</i>	Body	4,94E-05
cg21285198	1	1360970	<i>TMEM88B</i>	TSS1500	4,94E-05
cg24997845	2	191878460	<i>STAT1</i>	5'UTR	4,94E-05
cg26243551	6	99873348	<i>SFRS18</i>	TSS200	4,94E-05
cg00169917	10	120514287	<i>C10orf46</i>	1stExon; 5'UTR	5,64E-05
cg00571292	8	74792031	<i>UBE2W</i>	TSS1500	5,64E-05
cg03331123	5	67511540			5,64E-05
cg11539992	17	74497631	<i>RHBDF2</i>	TSS200	5,64E-05
cg25236894	17	5323110	<i>RPAIN</i> ; <i>NUP88</i>	Body; 1stExon; 5'UTR; TSS200	5,64E-05
cg27073311	6	155091036	<i>RBM16</i>	Body	5,64E-05
cg03523799	13	98913531	<i>FARP1</i>	Body	6,42E-05
cg05141341	7	44796036	<i>ZMIZ2</i>	Body	6,42E-05
cg09156140	5	43515218	<i>C5orf34</i>	TSS200	6,42E-05
cg16575530	2	8118404	<i>LOC339788</i>	TSS1500	6,42E-05
cg17737641	12	71834466	<i>LGR5</i>	Body	6,42E-05
cg24951140	8	29156846			6,42E-05
cg00048178	6	13488257	<i>GFOD1</i>	TSS1500	7,30E-05
cg10609205	3	112770222			7,30E-05
cg12389025	6	30028738	<i>ZNRD1</i> ;	TSS1500; Body	7,30E-05

<i>NCRNA00171</i>					
cg13826709	21	46708041	<i>POFUT2;</i> <i>LOC642852</i>	TSS1500; Body	7,30E-05
cg26322913	14	50999702	<i>MAP4K5; ATL1</i>	TSS1500; TSS200	7,30E-05
cg26326806	3	186153174			7,30E-05
cg01973920	5	980997			8,28E-05
cg07669969	5	60608527			8,28E-05
cg12181407	5	54052513			8,28E-05
cg14487854	17	714866	<i>NXN</i>	Body	8,28E-05
cg15208267	4	119760467			8,28E-05
cg24087403	10	71078535	<i>HK1</i>	Body; TSS200	8,28E-05
cg24532669	11	66112147	<i>BRMS1</i>	5'UTR	8,28E-05
cg25629418	12	1929265	<i>LRTM2;</i> <i>CACNA2D4</i>	TSS200; Body	8,28E-05
cg26529771	16	89260650	<i>CDH15</i>	Body	8,28E-05
cg27513517	1	183439365			8,28E-05
cg27519622	16	3079877	<i>CCDC64B</i>	Body	8,28E-05
cg00324520	15	41411926			9,39E-05
cg03460109	4	7427313	<i>SORCS2</i>	Body	9,39E-05
cg06214007	1	89829308	<i>GBP6</i>	TSS200	9,39E-05
cg06948111	8	64093405	<i>YTHDF3</i>	Body	9,39E-05
cg06994282	7	2005347	<i>MAD1L1</i>	Body	9,39E-05
cg12179554	13	114821832	<i>RASA3</i>	Body	9,39E-05
cg18322822	5	1119648			9,39E-05
cg19113641	2	20866242	<i>GDF7</i>	TSS200	9,39E-05
cg25004071	20	60639474	<i>TAF4</i>	Body	9,39E-05

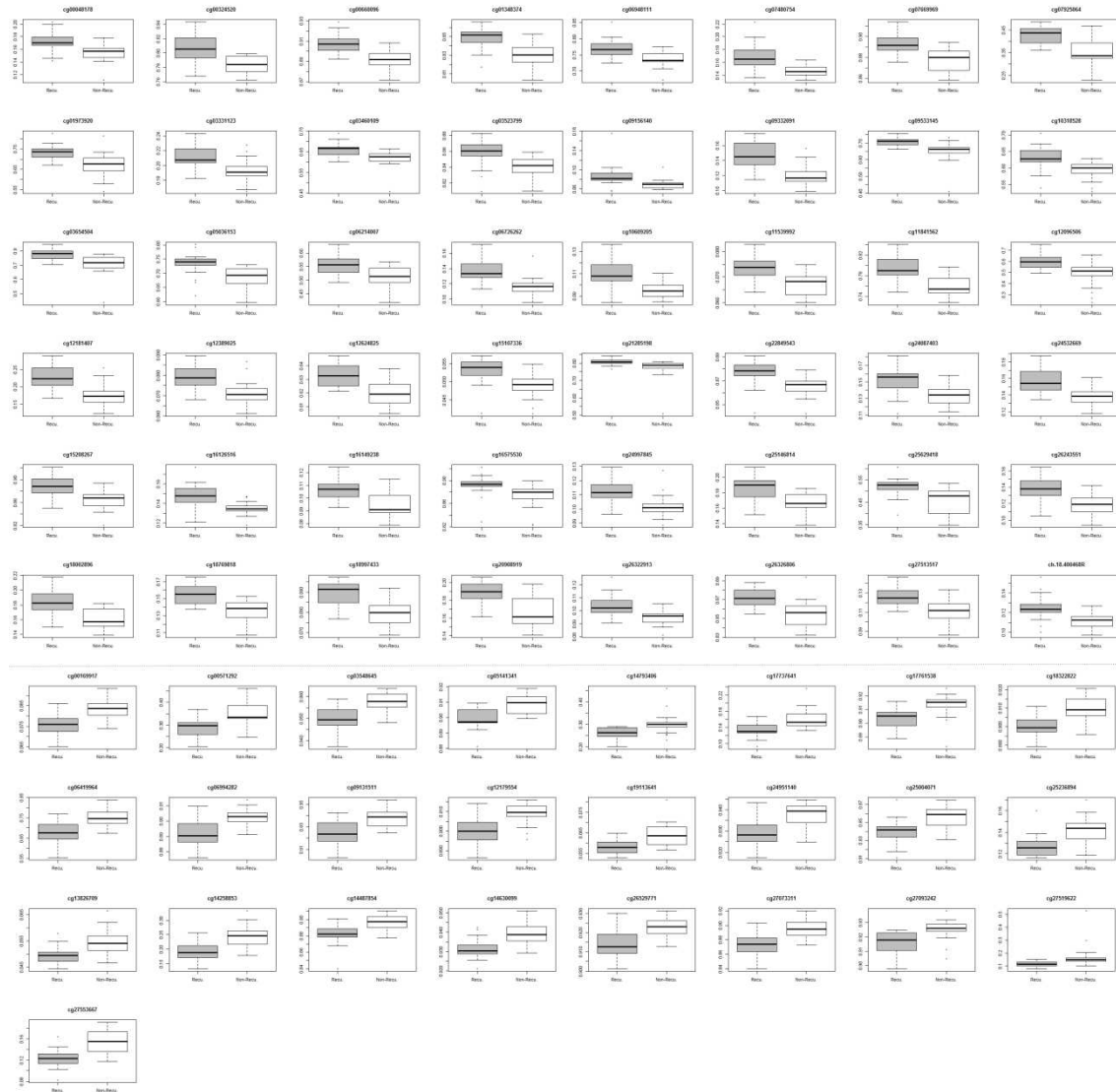
Supplemental Figure I: Density plot showing the distribution of normalized methylation levels in our data. Bimodal distribution was observed when considering all 451,518 CpG sites whereas approximately normal distribution was observed for most individually plotted CpG sites. (a) Beta across all CpGs analyzed; (b) Beta for one representative CpG (cg03548645). X-axis indicates methylation β -values and Y-axis frequency.



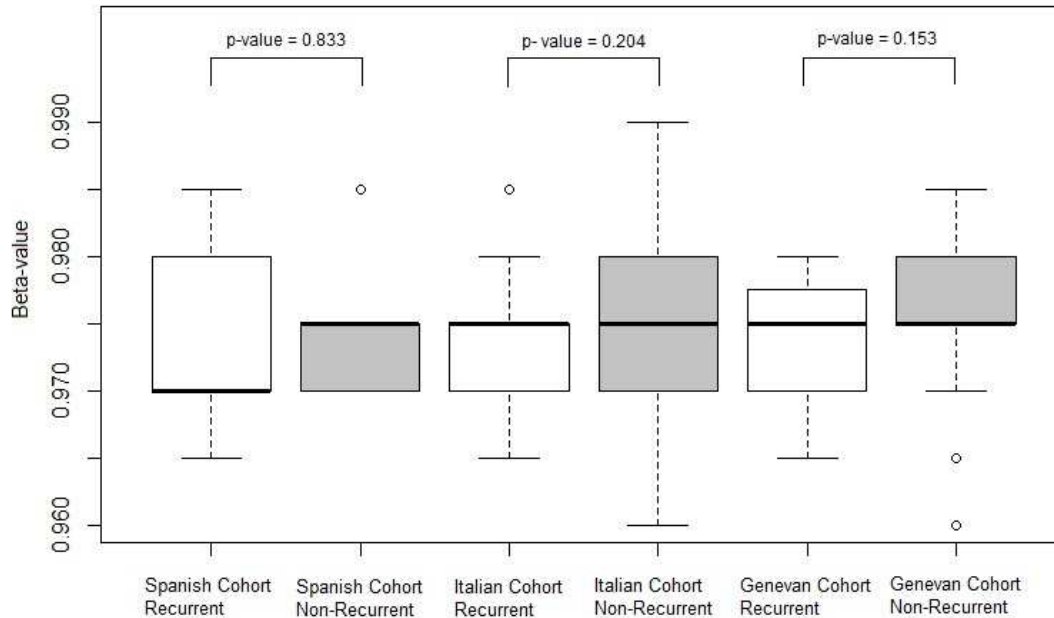
Supplemental Figure II: Clustering heatmap of the 73 differentially methylated CpG sites identified by 450k analysis. The green/red color bar indicates the sample type according to case-control classification in Figure 2. Each column represents a sample and each horizontal line represents the methylation levels of a given CpG across samples. Methylation levels are expressed as 0-1 β -values (green and red, unmethylated and completely methylated, respectively).



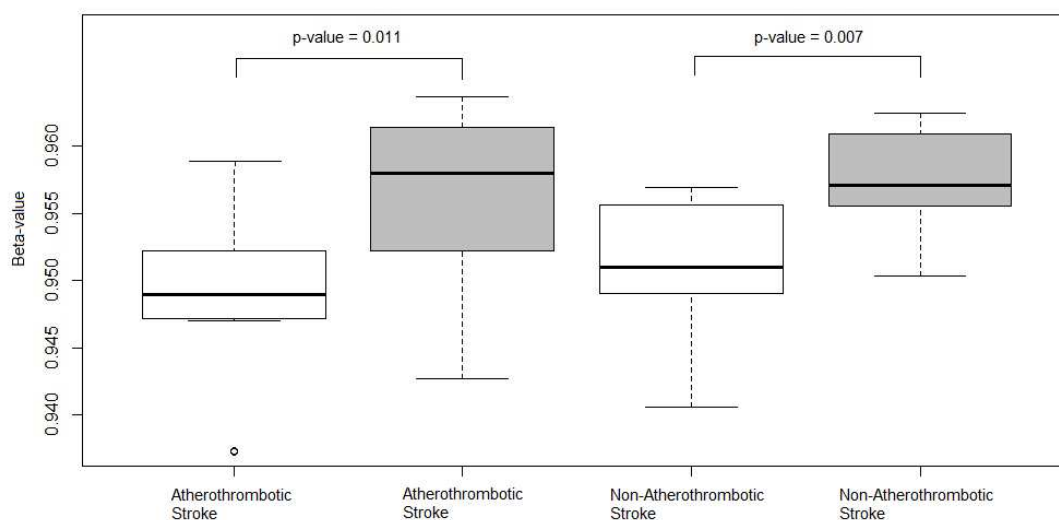
Supplemental Figure III: Box plot representation of 73 DMCs. 48 CpG sites show higher methylation levels in vascular recurrent patients than in non-vascular recurrent patients, above the line. 25 CpG sites show lower methylation levels in vascular recurrent patients than in non-vascular recurrent patients, below the line.



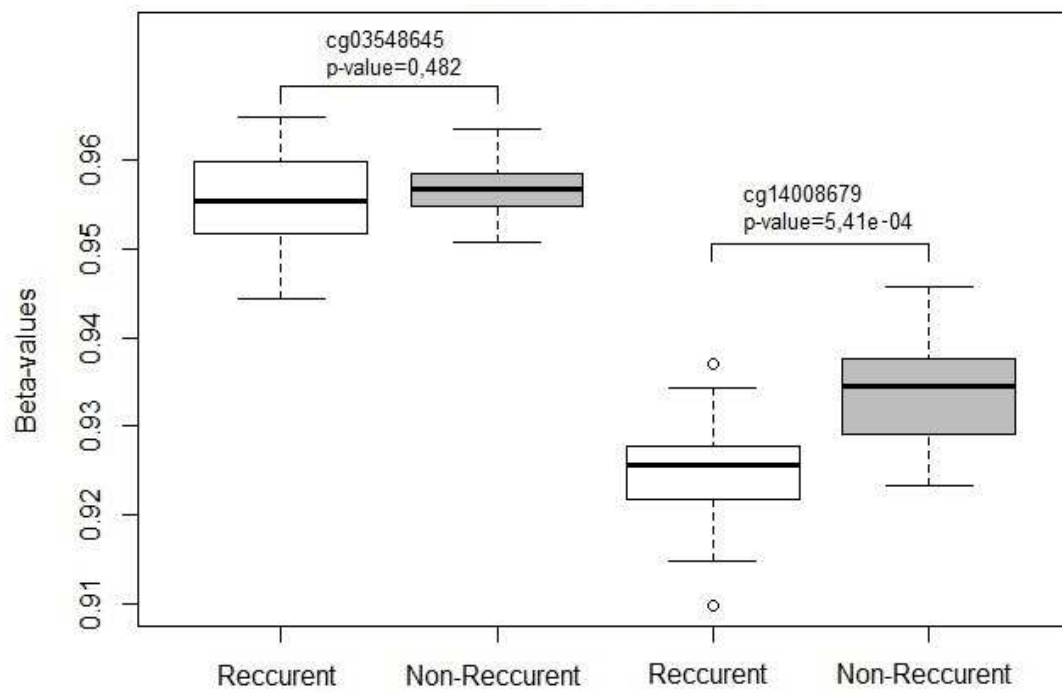
Supplemental Figure IV: Box plot representing the differences between recurrent and non-recurrent patients from each independent cohort of the validation study. X-axis: white box plots represent recurrent patients, and grey box plots represent non-recurrent patients. Y-axis: Methylation levels.



Supplemental Figure V: Box plot representing the cg03548645 methylation levels differences between recurrent and non-recurrent stroke patients within atherothrombotic and non-atherothrombotic patients. White box plots represent recurrent patients, and grey box plots represent non-recurrent patients.



Supplemental Figure VI: Box plot representing the *TRAF3* methylation levels differences between recurrent and non-recurrent stroke patients treated with aspirin. White box plots represent recurrent patients, and grey box plots represent non-recurrent patients.



4.3. ARTÍCULO 3

PPM1A methylation is associated with vascular recurrence in aspirin treated patients.

Gallego-Fabrega C, Carrera C, Reny JL, Fontana P, Slowik A, Pera J, Pezzini A, Serrano-Heras G, Segura T, Bin-Dukhyil AA, Martí-Fàbregas J, Muiño E, Cullell N, Montaner J, Krupinski J, Fernandez-Cadenas I.

Stroke. (in Press)

***PPM1A* methylation is associated with vascular recurrence in aspirin treated patients**

Cover title: Epigenetic regulation of *PPM1A*.

Cristina Gallego-Fabrega, MsC^{1,2}; Caty Carrera, MD MsC³; Jean-Luc Reny, MD, PhD^{4,5}; Pierre Fontana, MD, PhD^{5,6}; Agnieszka Slowik, MD PhD⁷; Joanna Pera, MD, PhD⁷; Alessandro Pezzini, MD⁸; Gemma Serrano-Heras, PhD⁹; Tomás Segura, MD, PhD⁹; Abdul-Aziz A. Bin Dukhyil, PhD¹⁰; Joan Martí-Fàbregas, MD, PhD¹¹; Elena Muiño, MD¹; Natalia Cullell, MsC¹; Joan Montaner, MD, PhD³, Jerzy Krupinski, MD PhD^{12,13}, Israel Fernandez-Cadenas, PhD^{1§}.

¹Stroke Pharmacogenomics and genetics, Fundació Docència i Recerca MutuaTerrassa, Hospital Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain.

²School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

³Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Division of Internal Medicine and Rehabilitation, Geneva University Hospitals, Switzerland

⁵Geneva Platelet Group, Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland.

⁶Division of Angiology and Haemostasis, Geneva University Hospitals, Switzerland.

⁷Department of Neurology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland.

⁸Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, Clinica Neurologica, Università degli Studi di Brescia, P.le Spedali Civili, 1, 25123 Brescia, Italy.

⁹Neurology department, Albacete Hospital, Albacete, Spain.

¹⁰College of Applied Medical Sciences. Majmaah University. Saudi Arabia.

¹¹Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain.

¹²Neurology Service, Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa, Spain.

School of Healthcare Science, Manchester Metropolitan University, Manchester, UK.

§Corresponding: Israel Fernández-Cadenas. Fundació Docència i Recerca MutuaTerrassa. C/ Sant Antoni 19, 08221 Terrassa, Spain. Email:israelcadenas@yahoo.es

Key words: Epigenetics, aspirin, vascular recurrence, stroke, *PPM1A*.

Abstract

Background: Despite pharmacogenetic studies efforts, the causes of aspirin failure to prevent the recurrence of ischemic events remain unclear. Our aim was to study whether epigenetics could be associated with the risk of vascular recurrence in aspirin treated stroke patients.

Material and Methods: We performed an epigenetic joint analysis study in 327 patients treated with aspirin. In the discovery stage we performed a nested case-control study in 38 matched ischemic stroke patients in whom 450.000 methylation sites were analyzed. Nineteen patients presented vascular recurrence after stroke, and 19 matched patients did not present vascular recurrence during the first year of follow up. In a second stage, 289 new patients were analyzed by EpiTYPER.

Results: Three candidate differentially methylated CpG sites (DMCs) were identified in the discovery stage and analyzed in the second stage; cg26039762 (p-value= $9,69 \times 10^{-06}$, *RAF1*), cg04985020 (p-value= $3,47 \times 10^{-03}$, *PPM1A*) and cg08419850 (p-value= $3,47 \times 10^{-03}$, *KCNQ1*). Joint analysis identified an epigenome-wide association for cg04985020 (*PPM1A*), p-value= 1.78×10^{-07} , with vascular recurrence in patients treated with aspirin.

Conclusions: The pattern of differential methylation in *PPM1A* is associated with vascular recurrence in aspirin-treated stroke patients.

Introduction

Ischemic stroke patients are at high risk of having new cardiovascular events. The cumulative risk of vascular recurrence after a first stroke reaches up to 48% at 10 years¹. Acetylsalicylic acid (aspirin) and clopidogrel, are the most widely used antiplatelet agents in secondary prevention of stroke. Aspirin has been associated with a relative risk reduction of 25% in secondary cardiovascular events and 13-15% in secondary prevention of stroke². A high platelet reactivity (HPR) phenotype can be present in up to 60% of aspirin-treated patients, and has been associated with an increased risk of recurrent ischemic events and, although it is a substantially heritable phenotype, very few genetic determinant have been identified. Furthermore, the causes of aspirin failure goes beyond HPR, and are still largely unknown³.

Only polymorphisms in *PEAR1* have been confirmed as genetic risk factors of aspirin failure⁴. The rs12041331 polymorphism is associated with platelet aggregation, increased platelet reactivity⁵, and vascular recurrence in aspirin treated patients⁴, although, these polymorphisms do not explain the whole variability observed in aspirin resistance or in vascular responsiveness. Other genomic regulations, such as epigenetics modifications could be associated with the risk of vascular recurrence in patients treated with aspirin.

We aimed to analyze the whole epigenome of stroke patients treated with aspirin, in order to find altered methylation sites associated with vascular recurrence.

Materials and Methods

Study patients

Thirty-eight subjects from a cohort of 1,900 ischemic stroke patients recruited prospectively at Vall d'Hebron Hospital (Spain), who started aspirin treatment after a first ischemic stroke were analyzed. Nineteen participants presented a new vascular event (ischemic stroke, myocardial infarction, peripheral vascular disease or cardiovascular death) during the first year of follow up, and were matched one-to-one (age, sex, TOAST) with nineteen participants without a vascular event. Second stage analysis was performed in 289 prospective enrolled participants from four independent cohorts with ischemic stroke or ischemic atherotrombotic disease, 29 presented a vascular recurrence within one year of follow-up (Supplemental Table I).

Discovery, HumanMethylation450 assay.

DNA was extracted from blood samples using standard methods. Samples were obtained during the first 24 hours after stroke onset, before initial aspirin administration.

ARTÍCULO 3

Genome-wide DNA methylation (DNAm) was assessed using the HumanMethylation450 (Illumina). All samples (n=38) were processed in a single working batch. QC and differentially methylated CpG sites (DMC) analysis were performed as described elsewhere⁶, using the R computing environment (3.1.3 version) (Supplemental Table II).

Rs120411331 polymorphism (*PEAR1*) was checked to discover whether it could be a confounding factor in the EWAS analysis.

CpGs selection.

One DMC with epigenome-wide significance⁷ (*RAF1*, p-value < 10⁻⁰⁶), was selected for further replication. Candidate DMCs for second stage analysis were defined as: top 100 significant DMCs from the univariate analysis, which also appear in the top 100 DMCs after multivariable analysis. Multivariable analyses were adjusted for principal components, and DNAm potential covariates (age, sex, and current smoking). From a total of 36 candidate CpGs, those mapped on genes previously associated with cardiovascular disease, were considered for further analysis. A Pubmed search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) was undertaken using the key words: aspirin, atherosclerosis, cardiovascular, stroke and vascular. Finally, from four candidate DMCs, only two CpGs (*PPM1A* and *KCNQ1*) were located in regions suitable for EpiTYPER analysis (Supplemental Figure IV).

Second stage, EpiTYPER assay.

An averaged 400 bp region was sequenced using EpiTYPER (Sequenom) around each CpG selected from the discovery stage in 289 new patients.

Statistical analysis.

DMC sites were calculated using the Mann-Whitney U-test, and multivariable generalized linear analysis. Sample size calculation indicated that nineteen subjects per condition were needed in order to achieve a 10⁻⁰⁵ significance level and 80% statistical power. A joint analysis strategy using the DerSimonian-Laid test, was performed to increase the statistical power in the two stages study as previously suggested⁸.

Complete methodology in the Supplemental Material.

Results.

Discovery.

DNAm levels were obtained for 485,577 CpGs sites (Figure 1.A). After pre-processing and QC analysis one DMC was epigenome-wide significantly associated with vascular recurrence (p-

value $<10^{-06}$), covariant adjustment analysis was also performed (Table 1 and Table IV). Table IV shows the 36 candidate CpG sites which were best ranked in both, univariate and covariate analysis including cg04985020 (*PPMIA*) and cg08419850 (*KCNQ1*). Figure 1.B shows a hierarchical cluster analysis, able to distinguish vascular recurrence patients from non-vascular patients, with only two samples misclassified.

Second stage analysis.

Second stage analysis was performed for the epigenome-wide significant CpG, cg26039762 (*RAF1*) p-value=9.69x10⁻⁰⁶, and two additional candidate CpG sites, cg04985020 (*PPMIA*) p-value=3.46x10⁻⁰⁴; and cg08419850 (*KCNQ1*), p-value=3.46x10⁻⁰⁴. All three CpGs map genes involved in atherosclerosis and vascular process. The cg04985020 (*PPMIA*) was associated with vascular recurrence, p-value=0.027 The same cg04985020 methylation pattern was observed in each of the four validation-stage cohorts and when non-stroke and cardioembolic patients were excluded from the analyses (Supplemental Material). Additionally, 3 CpG sites surrounding cg26039762 (*RAF1*) were *de novo* associated with vascular recurrence, RAR1_10 p-value=0.0015, RAF1_6 p-value=0.0043, RAF1_3 p-value=0.01 (Supplemental Table VI). However, cg26039762 (*RAF1*) and cg08419850 (*KCNQ1*) were not associated in this second stage.

Joint analysis of discovery and replication stage revealed an epigenome-wide statistically significant meta p-value⁸ for *PPMIA* (meta-p=1.78x10⁻⁰⁷), but not for *RAF1*. *PPMIA* was independently associated with vascular recurrence when analyzed possible DNAm confounding factors (age, sex and current smoking) p-value=5.74x10⁻⁰³, and also *PEAR1* polymorphism (rs12041331) p-value=9.82x10⁻⁰³. Additionally, *PPMIA* methylation levels were not influenced by cell-type proportions.

Discussion

Patients with vascular recurrence presented higher methylation levels of cg04985020 CpG (*PPMIA*) compared to non-recurrent patients. Despite cg04985020 not being significant on the epigenome-wide level, in the discovery stage (p-value=3.46x10⁻⁰⁴), the joint analysis revealed a meta p-value=1.78x10⁻⁰⁷ that was significant on the epigenome-wide level⁷. These results suggest an association between DNAm levels of *PPMIA* and vascular recurrence during on-aspirin treatment, regardless of the disease (cardiovascular or stroke). The association was not confounded by common DNAm confounding factors or *PEAR1* polymorphism. The cg26039762 (*RAF1*), was not replicated, but three surrounding CpGs were associated *de novo* with vascular recurrence. Patients with vascular recurrence presented lower methylation levels of these three surrounding CpGs compared to non-vascular recurrence patients, similar to cg26039762 (*RAF1*)

ARTÍCULO 3

in the discovery stage. Additionally, hierarchical cluster analysis showed a potential role of DMCs as a model to classify patients within highest or lowest risk of vascular recurrence.

Protein phosphatase magnesium dependent 1A (*PPM1A*) is involved in the regulation of TGF- β 1 signalling and plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*) transcription⁹. PAI-1 levels are associated with increased risk of cardiovascular events, particularly in the context of elevated tissue TGF- β 1¹⁰. Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (*RAF1*) has been described in many vascular related diseases, such as vascular dementia, angiogenesis processes or cardiovascular events¹¹. *RAF1* has also been described as taking part in signal transduction in the TGF- β /Smad pathway¹². Furthermore, aspirin administration has been associated with decreasing TGF- β 1 serum levels in hypercholesterolemic rats¹³. We hypothesize that *PPM1A* and *RAF1* altered methylation could be associated with vascular recurrence due to the regulation of the TGF- β pathway, however further studies are needed to confirm this hypothesis.

Pharmacoeugenomics is a growing field that could be used in the future to assist in personalized antiplatelet therapy or to find potential new drug targets. Our study suggests a remarkable role for epigenetics in the modulation of aspirin response.

Limitations

The small sample size in the discovery stage impeded the achievement of more significant values, however joint-analysis was useful to improve the results of our study. mRNA studies are needed to confirm the biological significance of our results.

Funding Sources

Miguel Servet grant (CP12/03298, Instituto de Salud Carlos III and FEDER), Sheikh Abdullah Bin Abdul Mohsen Al Tuwaijri Chair for Applied Research in Stroke, Majmaah University, Saudi Arabia, and SEDMAN Project. Joanna Pera is supported by the JUMC No K/ZDS/003844 grant.

Disclosures

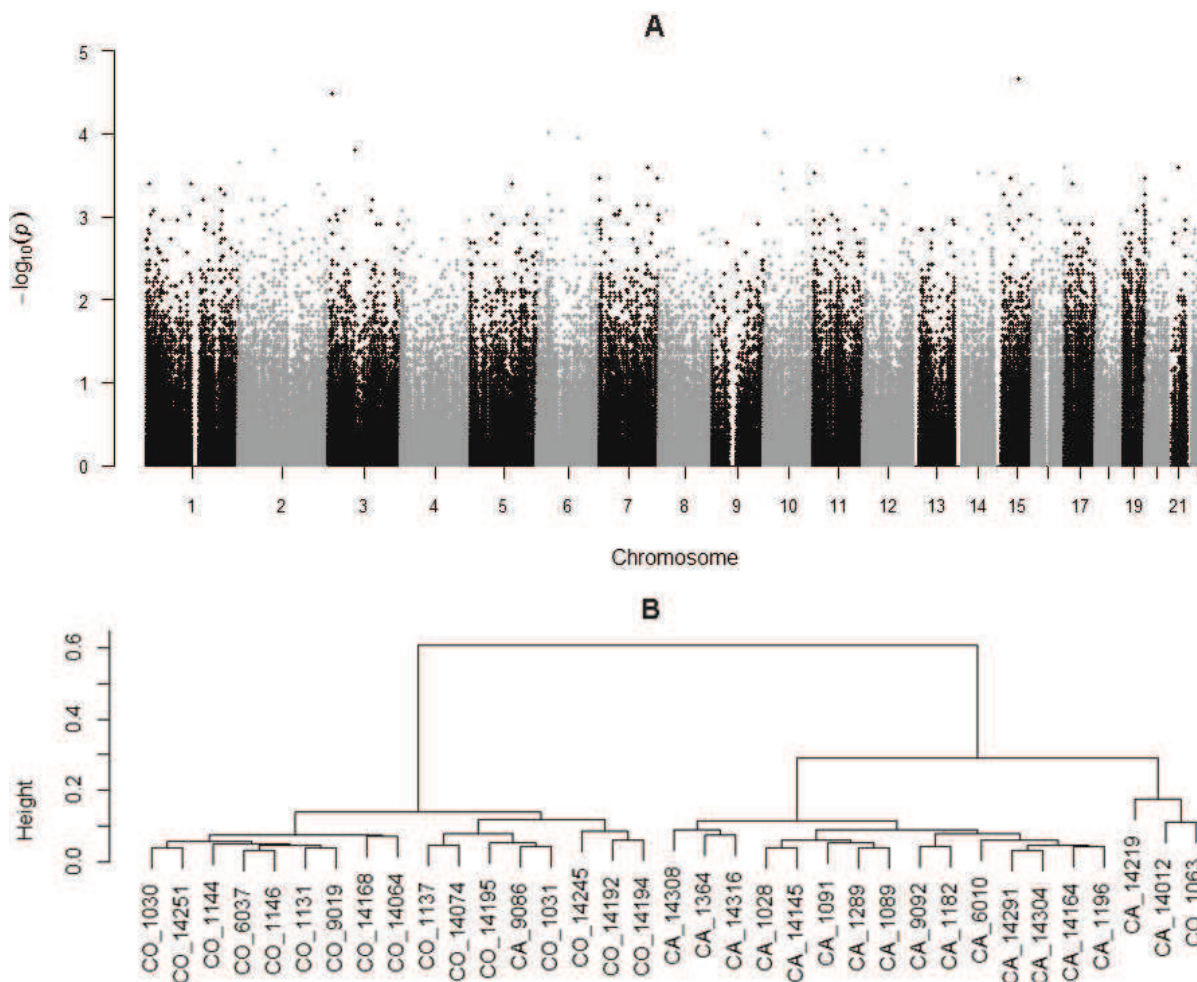
None.

References

1. van Wijk I, Kappelle LJ, van Gijn J, Koudstaal PJ, Franke CL, Vermeulen M, et al. Long-term survival and vascular event risk after transient ischaemic attack or minor ischaemic stroke: a cohort study. *Lancet*. 2005;365:2098–104.
2. Greer DM. Aspirin and antiplatelet agent resistance: Implications for prevention of secondary stroke. *CNS Drugs*. 2010;24:1027–1040.
3. Pettersen AA, Arnesen H, Seljeflot I. A brief review on high on-aspirin residual platelet reactivity. *Vascul. Pharmacol.* 2015;67-69:6–9.
4. Lewis JP, Ryan K, O'Connell JR, Horenstein RB, Damcott CM, Gibson Q, et al. Genetic variation in PEAR1 is associated with platelet aggregation and cardiovascular outcomes. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2013;6:184–92.
5. Würtz M, Nissen PH, Grove EL, Kristensen SD, Hvas A-M. Genetic determinants of on-aspirin platelet reactivity: focus on the influence of PEAR1. *PLoS One*. 2014;9:e111816.
6. Gallego-Fabrega C, Carrera C, Reny J, Fontana P, Slowik A, Pera J, et al. TRAF3 epigenetic regulation is associated with vascular recurrence in ischemic stroke patients. *Stroke*. 2016;47(5):1180-6
7. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat. Rev. Genet.* 2011;12:529–41.
8. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 2006;38:209–213.
9. Samarakoon R, Chitnis SS, Higgins SP, Higgins CE, Krepinsky JC, Higgins PJ. Redox-Induced Src Kinase and Caveolin-1 Signaling in TGF- β 1-Initiated SMAD2/3 Activation and PAI-1 Expression. *PLoS One*. 2011;6:e22896.
10. Otsuka G. Transforming Growth Factor Beta 1 Induces Neointima Formation Through Plasminogen Activator Inhibitor-1-Dependent Pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:737–743.
11. Liu Z, Liu Y, Li L, Xu Z, Bi B, Wang Y, et al. MiR-7-5p is frequently downregulated in glioblastoma microvasculature and inhibits vascular endothelial cell proliferation by targeting RAF1. *Tumour Biol*. 2014;35:10177–84.
12. Watanabe-Takano H, Takano K, Hatano M, Tokuhisa T, Endo T. DA-Raf-Mediated Suppression of the Ras--ERK Pathway Is Essential for TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Type 2 Cells. *PLoS One*. 2015;10:e0127888.
13. Mohamed AR, El-Hadidy WF, Mannaa HF. Assessment of the prophylactic role of aspirin and/or clopidogrel on experimentally induced acute myocardial infarction in hypercholesterolemic rats. *Drugs R. D.* 2014;14:233–9.

Figure Legends

Figure 1: A. Manhattan Plot for the EWAS of aspirin treated stroke patients. X-axis: chromosome position; Y-axis: $-\log_{10}$ of p-values. B. Hierarchical cluster analysis of most significant DMC associated (Table 1) with vascular recurrence. CA: recurrence patients, CO: non-recurrence patients.



Tables

Table 1: DMC sites associated with vascular recurrence (p-value<10⁻⁰⁵).

DMCs associated with vascular recurrence.		
Univariate analysis.		
CpG ID	Gene	p-value
cg26039762	RAF1	9,69E-06
cg00094487	SPG21	1,20E-05
cg26568880	RDBP; SKIV2L	1,47E-05
cg20702204	CHFR	2,19E-05
cg22352818		2,19E-05
cg01112035		2,19E-05
cg16966962	LMOD1	3,23E-05
cg09747456	PANK1	3,90E-05
cg07580707	XPC; LSM3	4,69E-05
cg02533998		5,62E-05
cg00932677		6,72E-05
cg08859247		6,72E-05
cg00608860	MTHFSD; FLJ30679	6,72E-05
cg16933664	LOC100130987	8,02E-05
cg08808677		8,02E-05
cg26577201	CRYBA2	8,02E-05

Supplemental Material

Materials and Methods

Clinical protocol

From a cohort of 1,900 stroke patients from Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain), 38 subjects were selected. 19 ischemic stroke patients treated with aspirin with a new vascular event (new ischemic stroke, myocardial infarction, peripheral vascular disease and cardiovascular death) and 19 ischemic stroke patients treated with aspirin without a new vascular event were matched one-to-one by age (± 7 years), sex, and TOAST¹ classification (Table I).

Cases were defined as ischemic stroke patients under aspirin treatment which had vascular recurrence in the first year of follow up with a good adherence to the treatment measured by the Morisky-Green test², controls were defined as ischemic stroke patients under aspirin treatment with a good adherence to the treatment measured using the Morisky-Green test and without vascular recurrence during the first year of follow up. Vascular recurrence was described as new ischemic stroke, myocardial infarction, peripheral vascular disease or cardiovascular death and was detected by phone calls every three months or direct clinical reporting.

Second stage analysis was performed on 289 new samples from 4 international cohorts, three ischemic stroke patients' cohorts and one cardiovascular disease patients' cohort. The second stage cohort included 29 patients with a new vascular event and 261 patients without a new vascular event during the first year of follow up (Table II). The Italian, Spanish and Polish cohorts consist of consecutively recruited patients that started aspirin treatment after the first ischemic stroke. Vascular recurrence information was available from all patients. The Geneva cohort consists of consecutively recruited patients with symptomatic documented ischemic atherothrombotic disease (coronary artery disease [CAD], ischemic cerebrovascular disease and/or peripheral artery disease) treated with aspirin and/or clopidogrel for < 5 years. Information about clinical ischemic events over an ongoing 3-year follow-up was available from all patients. Only aspirin treated patients were selected from this cohort.

The local ethical committee approved the study (PR(AG) 03/2007).

Discovery, HumanMethylation450 assay.

Genome-wide DNA methylation was assessed using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina Inc., San Diego Ca). All samples were processed in a single working batch.

All pre-processing, correction and normalization steps were implemented using the R statistical computing environment (3.1.3 version) with Bioconductor packages, (Table III). Plots were also produced using R functions. Quality control metrics were examined to determine the success of the bisulphite conversion and subsequent array hybridization. Fluorescence intensities were imported from GenomeStudio, then probe filtering was performed to remove probes that have failed to hybridize (detection p-value>0.05) and that were not represented by a minimum of 3 beads on the array, as described elsewhere^{3,4}. CpG sites containing documented single nucleotide polymorphisms (SNPs) were also excluded⁵. Multidimensional scaling (MDS) plots were used to evaluate gender outliers based on chromosome X data. MDS and PC were also used to check unknown population structures within the sample. Then, probes mapping to sex chromosomes were removed. We also checked the white cell count (neutrophils, lymphocytes and monocytes) as a possible confounding factor. Finally, a subset quantile normalization was performed using a background adjustment between-array normalization and a dye bias correction, following previous recommendations⁴.

The methylation level of each cytosine was expressed as a Beta value (β -value), ranging between 0 and 1, unmethylated to completely methylated respectively. Differentially methylated CpG sites (DMCs) were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney U test for independent samples, p-values<10⁻⁰⁶ were selected as statistically significant⁶ and p-values<10⁻⁰⁵ as having nominal association. Multivariable generalized linear analyses adjusting for Principal Components and DNA methylation potential covariates (age, sex and current smoking) were also used.

Second stage, EpiTYPER assay.

Quantitative DNA methylation analysis was performed using the MassARRAY EpiTYPER (Sequenom, San Diego, CA, USA), on selected CpGs. An averaged 400 pb region was sequenced around each selected CpGs, containing multiple CpG sites and aggregated CpG sites. Target-specific primers were designed using the online Epidesigner software (<http://www.epidesigner.com>), table V. The quantitative methylation data obtained for each CpG site, or aggregates of multiple CpG sites, were analyzed with the EpiTYPER software (Sequenom). Statistical analyses were performed using R (3.1.3 version). P-values<0.05 were considered as statistically significant, after the Mann-Whitney U test.

PEAR1 analysis.

OmniQuad Human 1M array (Illumina) was used to genotype the samples. Data was analyzed following WTCC recommendation and the specific methodological guidelines from the Broad Institute and Harvard University. Quality controls (QC) were performed before the analyses: Missings (-0.3) and checksex QCs were performed for each individual. Only individuals with

ARTÍCULO 3

Caucasian ethnicity were included. We also tested for population stratifications by analyzing the individual IBS, performing MDS plots and adjusting for principal components (PCs). Hardy-Weinberg ($p\text{-value} > 10^{-08}$), missingness (0.01), Mishap ($p\text{-value} > 10^{-09}$), were analyzed for each SNP.

After the QC process, the genotypic results were analyzed by Plink, Haploview, STATA, SNPtest and GTOOL software solutions.

Statistical analysis.

Sample size calculation was performed using the pwr package (version: 1.1-2) from Bioconductor (www.bioconductor.org). Nineteen subjects per condition were needed in order to achieve a 10^{-05} significance level and 80% statistical power, considering a Cohen's effect size = 0.9.

Results

Epigenome-wide analysis.

DNA methylation levels were obtained for 485.577 CpG sites across the whole genome. After pre-processing and QC analysis, 34.999 probes and three sample were removed from further analysis: 1.209 CpGs with detection $p\text{-value} > 0.05$, 1.765 CpGs with a beadcount lower than 3 in more than 5% of the samples, 20.935 CpGs overlapping with SNPs and 11.090 CpGs located on sex chromosomes. One samples was removed because 1% of the CpG sites had detection $p\text{-values} > 0.05$ (Figure I.A) and two more samples were removed because they showed sex discrepancies (Figure I.B).

A heatmap of the 16 differentially methylated CpGs is shown in the supplemental material, Figure II.

Second stage analysis.

Higher methylation levels of cg04985020 (PPM1A) were observed in vascular recurrence patients treated with aspirin in each of the four validation-stage cohorts. The same pattern was observed after excluding the Geneva's non-stroke patients and the cardioembolic stroke patients, although the association was not statistically significant due to a reduction of the sample size (Figure III). Indicating that cg04985020 (PPM1A) association with vascular recurrence may be independent of the cardiovascular disease.

Further analysis

Frequency distribution of the rs12041331 risk allele was equally distributed between patients (6 vascular recurrent patients) and controls (2 non-vascular recurrence patients) $p\text{-value} = 0.076$.

The Laboratory of Stroke Pharmacogenomics and Genetics is part of the International Stroke Genetics Consortium (ISGC, www.strokegenetics.com) and coordinates the Spanish Stroke Genetics Consortium (Genestroke, www.genestroke.com). I. F-C. is supported by the Miguel Servet programme (CP12/03298), Instituto de Salud Carlos III. We thank Dr. Raid S Al Baradie for providing the necessary support

References

1. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35–41.
2. Morisky DE, Green LW, Levine DM. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence. *Med. Care*. 1986;24:67–74.
3. Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 2012;4:325–41.
4. Pidsley R, Y Wong CC, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*. 2013;14:293.
5. Price ME, Cotton AM, Lam LL, Farré P, Emberly E, Brown CJ, et al. Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6:4.
6. Rakyán VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat. Rev. Genet*. 2011;12:529–41.

Tables.

Table I: Descriptive characteristics of the study population. Discovery cohort n=38, validation cohort n=289.

	Vascular Recurrence	Non- Vascular Recurrence	Vascular Recurrence	Non- Vascular Recurrence
	Discovery Stage Cohort (n= 38)		Second Stage Cohort (n= 289)	
N	19 (50%)	19 (50%)	29 (10%)	260 (90%)
Age (years)	69.2±12.9	68.9±12.8	69±10	65±12
Male	17 (89.4%)	17 (89.4%)	17 (58.5%)	183 (69.5%)
Female	2 (10.5%)	2 (10.5%)	12 (41.3%)	77 (29.3%)
TOAST				
<i>Atherothrombotic</i>	7 (21%)	7 (21%)	1 (3.4%)	12 (4.6%)
<i>Lacunar</i>	3 (15.8%)	3 (15.8%)	1 (3.4%)	10 (3.8%)
<i>Cardioembolic</i>	-	-	6 (20.6%)	20 (7.6%)
<i>Undetermined</i>	9 (47.3%)	9 (47.3%)	10 (34.4%)	38 (14.4%)
<i>Other</i>			1 (3.4%)	9 (3.4%)
Dyslipidemia	11 (57.9%)	6 (31.6%)	6 (20.6%)	90 (34.2%)
Diabetes Mellitus	8 (42.1%)	3 (15.8%)	12 (41.3%)	65 (24.7%)
Hypertension	11 (57.9%)	11 (57.9%)	21 (72.2%)	154 (58.5%)
Current Smoker	4 (21%)	5 (31.6%)	8 (27.5%)	67 (25.5%)
Alcohol intake	7 (21%)	4 (21%)		

Table II: Descriptive characteristics of each international cohort of the second stage analysis.

	Geneva's Cohort (178)		Polish's Cohort (59)		Italy's Cohort (26)		Spanish's Cohort (27)	
	Rec	Non-Rec	Rec	Non-Rec	Rec	Non-Rec	Rec	Non-Rec
N	10 (5,6%)	168 (94,4%)	13 (21,9%)	46 (77,7%)	2 (7,7%)	24 (92,4%)	4 (14,8%)	23 (85,1%)
Age (years)	69±9	64±11	70±10	66±12	76±10	66±13	66±11	60±12
Male	8 (80%)	127 (74,9%)	7 (53,8%)	24 (52,2%)	1 (50%)	16 (66,6%)	1 (25%)	17 (73,8%)
Female	2 (20%)	41 (24,2%)	6 (46,1%)	22 (47,7%)	1 (50%)	8 (33,3%)	3 (75%)	6 (26%)
TOAST								
<i>Atherothrombotic</i>	-	32 (19%)	-	2 (4,3%)	1 (50%)	7 (29,1%)	-	3 (13%)
<i>Lacunar</i>	-	-	1 (7,7%)	5 (10,9%)	-	3 (12,5%)	-	2 (8,7%)
<i>Cardioembolic</i>	-	-	5 (38,5%)	19 (41,23%)	-	-	1 (25%)	1 (4,3%)
<i>Undetermined</i>	-	-	7 (53,8%)	19 (41,2%)	-	2 (8,3%)	3 (75%)	17 (73,8%)
<i>Other</i>	-	-	-	1 (2,27%)	1 (50%)	8 (33,3%)		
Dyslipidemia	5 (50%)	88 (51,9%)	-	-	-	-	1 (25%)	2 (8,7%)
Diabetes Mellitus	1 (10%)	39 (23%)	8 (61,5%)	20 (43,4%)	2 (100%)	3 (12,5%)	1 (25%)	3 (13%)
Hypertension	7 (70%)	101 (59,66%)	9 (69,2%)	35 (75,9%)	2 (100%)	11 (45,8%)	3 (75%)	7 (30,4%)
Current Smoker	4 (40%)	42 (24,8%)	3 (23,1%)	12 (26%)	-	8 (33,3%)	1 (25%)	5 (21,7%)

Table III: Bioconductor packages for the processing and analysis of array-based DNA methylation data.

DNA methylation processing/analysis step	Bioconductor packages	Commands
Methylation data loading	MethyLumi	methylumiR()
Quality control sample/probe	wateRmelon, minfi	pfilter() mdsPlot()
Normalization and background correction	wateRmelon	dasen()

Table IV: DMC sites associated with vascular recurrence (p -value $<10^{-05}$). List of the 36 candidate DMC sites which were best ranked in both, raw and covariate analysis. Six CpGs, highlighted in bold letters, were initially selected for further analysis, even though finally only RAF1, PPM1A and KCQ1 CpG sites were suitable for MassARRAY EpiTYPER analysis.

DMCs associated with vascular recurrence. Univariate analysis.					
CpG ID	Chr	Position	Gene	p-value	Covar. p-value
cg26039762	3	13177788	RAF1	9,69E-06	0,01815912
cg00094487	15	65255928	SPG21	1,20E-05	0,00493098
cg26568880	6	31926569	RDBP; SKIV2L	1,47E-05	0,00253664
cg20702204	12	133430077	CHFR	2,19E-05	0,00274526
cg22352818	2	97193289		2,19E-05	0,00345245
cg01112035	2	105200688		2,19E-05	0,08986818
cg16966962	1	201915989	LMOD1	3,23E-05	0,00815474
cg09747456	10	91405300	PANK1	3,90E-05	0,0031413
cg07580707	3	14220061	XPC; LSM3	4,69E-05	0,00633959
cg02533998	12	101540053		5,62E-05	0,29100396
cg00932677	4	187776068		6,72E-05	0,00305652
cg08859247	17	17286854		6,72E-05	0,00848049
cg00608860	16	86588622	MTHFSD; FLJ30679	6,72E-05	0,08698691
cg16933664	11	67085326	LOC100130987	8,02E-05	0,00328628
cg08808677	2	6911141		8,02E-05	0,00630309
cg26577201	2	219857793	CRYBA2	8,02E-05	0,00745067
36 candidate DMCs best ranked in both, univariate and covariate analysis					
CpG ID	Chr	Position	Gene	p-value	Covar. p-value
cg00094487	15	65255928	SPG21	1,20E-05	0,00493098
cg26568880	6	31926569	RDBP	1,47E-05	0,00253664
cg20702204	12	133430077	CHFR	2,19E-05	0,00274526
cg22352818	2	97193289		2,19E-05	0,00345245
cg09747456	10	91405300	PANK1	3,90E-05	0,0031413
cg07580707	3	14220061	XPC;LSM3	4,69E-05	0,00633959
cg00932677	4	187776068		6,72E-05	0,00305652
cg08808677	2	6911141		8,02E-05	0,00630309
cg16933664	11	67085326	LOC100130987	8,02E-05	0,00328628
cg26577201	2	219857793	CRYBA2	8,02E-05	0,00745067
cg05529249	2	24272480	FKBP1B	0,00011304	0,00542232
cg08121755	12	52545978		0,00015767	0,00743803
cg25379116	1	160254873	PEX19	0,00015767	0,00417774

cg16413445	16	75659884		0,00018548	0,00501087
cg23130010	6	29855462	HLA-H	0,00018548	0,0055877
cg02076826	15	61477299	RORA	0,00021767	0,00547324
cg08015776	21	27543229	APP	0,00021767	0,00358557
cg05500125	15	101390023		0,0002548	0,00476859
cg03968943	16	1121050	LOC146336	0,00029758	0,00522032
cg06651180	7	101559888	CUX1	0,00029758	0,00689386
cg16618752	1	230080330		0,00029758	0,00580725
cg17965019	6	27858545	HIST1H3J	0,00029758	0,00517746
cg23289021	13	69459913		0,00029758	0,00688949
cg00814733	12	4382051	CCND2	0,00034671	0,00564052
cg04985020	14	60711502	PPM1A	0,00034671	0,00574663
cg08419850	11	2569801	KCNQ1	0,00034671	0,00481029
cg24311382	6	132272408	CTGF	0,00034671	0,00382345
cg00822187	8	26291560		0,00040304	0,00666538
cg02587673	7	592662	PRKAR1B	0,00040304	0,00679647
cg07979106	13	98086433	RAP2A	0,00040304	0,00747707
cg25066224	17	19617395	SLC47A2	0,00040304	0,00557317
cg04646186	15	27215757	GABRG3	0,00046747	0,0058128
cg06006403	20	305636	SOX12	0,00046747	0,00453558
cg09044174	20	60308212	CDH4	0,00046747	0,00486864
cg10799705	19	4358875	MPND	0,00046747	0,00737485
cg21546286	11	48923668		0,00046747	0,00702784

Table V: Sequences of primers used in the MassARRAY EpiTYPER second stage analysis.

Gene	Primer*	Size	Sequence	Product Size	N° of CpG's	Coverage
<i>PPM1A</i>	LP	25	GTAGGTTAGGGTGTAGGGGTATGAT	484	8	8
	RP	25	CTTACAACCCAAAAACAAATTCAAC			
<i>KCNQ1</i>	LP	25	TGTTGTTTTTTTTGGATTTTGT	499	17	12
	RP	25	CATTTATACACAACCTAAACACCCC			
<i>RAF1</i>	LP	25	TATGTTTTGGTTATGGGAGGTTT	335	10	10
	RP	25	ACCCCAATTTAAAAATAATTCCC			

* LP, Left Primer; RP, Right Primer.

Table VI: Differentially methylated CpG sites identified *de novo* in the EpiTYPER second stage analysis.

CpG ID	Chr	Gene	p-value
PPM1A_4	14	PPM1A	0.02733
RAF1_3	3	RAF1	0.01049
RAF1_6	3	RAF1	0.00432
RAF1_10	3	RAF1	0.00153

Figures.

Figure I: Quality control analysis. (a) Density plot showing the methylation levels distribution in each sample. The same bimodal distribution was observed in all samples except for one sample (removed from further analysis). X-axis indicates methylation β -values and Y-axis frequency, each line represents one sample. (b) Multidimensional Scaling plot showing two clusters, male samples and female samples. Two samples (indicated by arrow) were group in the wrong cluster (removed from further analysis). X-axis indicates the first dimension of variance and Y-axis indicates the second dimension of variance.

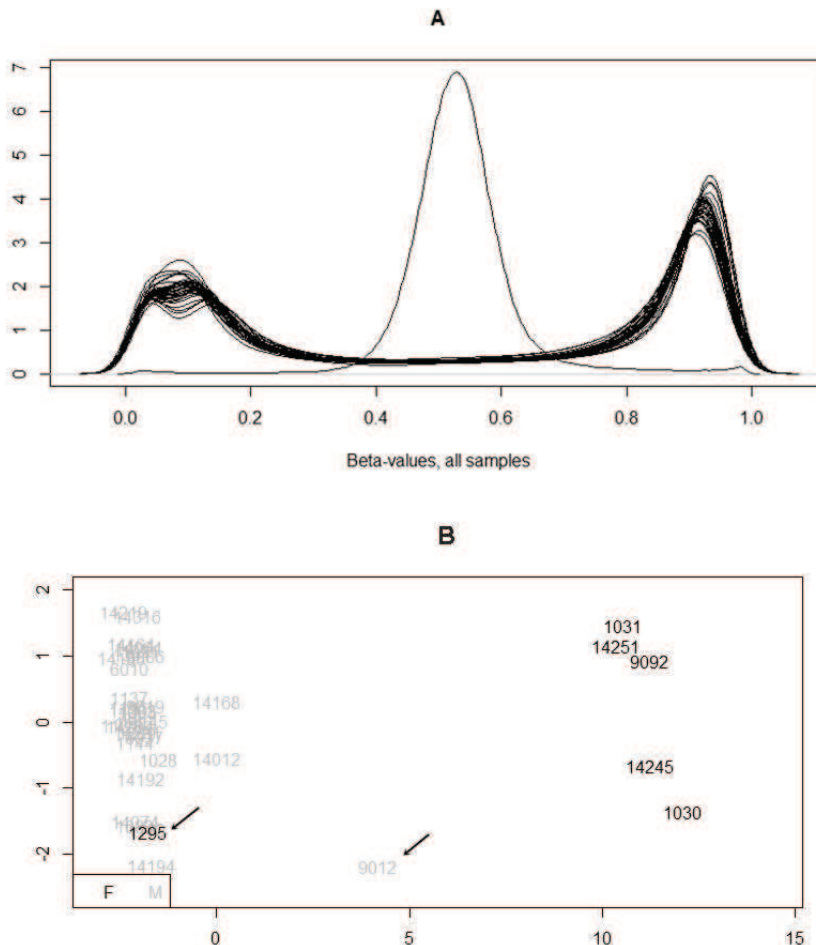


Figure II: Clustering heatmap of the 16 differentially methylated CpG sites identified by 450k analysis. Each column represents a sample and each horizontal line represents the methylation levels of a given CpG across samples. Methylation levels are expressed as 0-1 β -values (green and red, unmethylated and completely methylated, respectively).

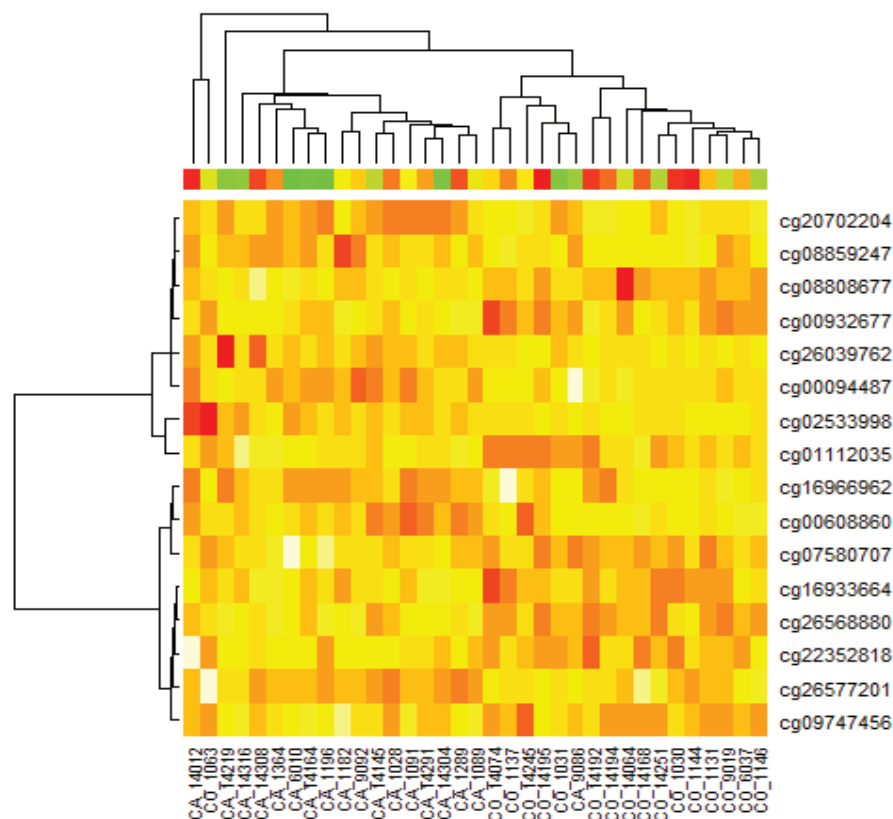


Figure III: PPM1A methylation levels on stroke and cardiovascular patients, only stroke patients, and no-cardioembolic stroke patients from validation cohorts. All three analysis show higher methylation levels of vascular recurrent patients compared with non-vascular recurrent patients, regardless of the pathology (stroke or cardiovascular disease).

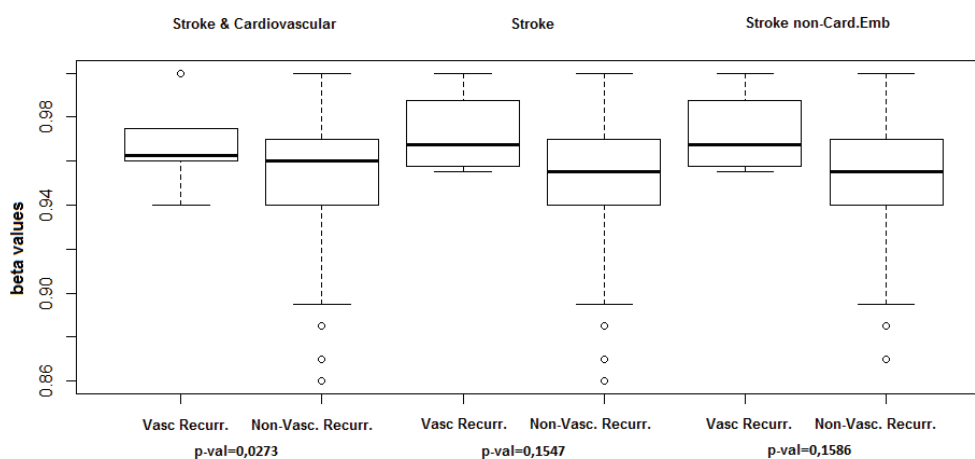
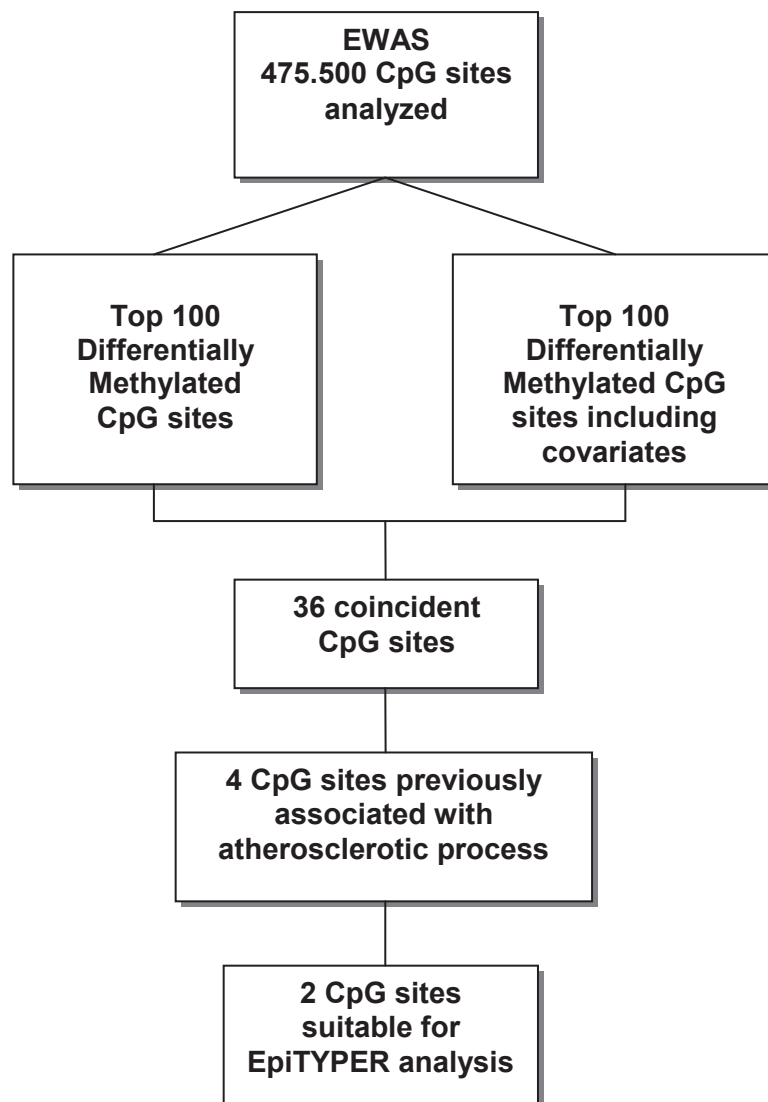


Figure IV: Diagram of candidate CpG sites selected for second stage study.



DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

En los trabajos que componen esta tesis doctoral hemos observado que la epigenética, y en concreto la metilación del ADN, se asocia con las diferencias interindividuales en la respuesta al tratamiento antiplaquetario (aspirina y clopidogrel). Además hemos demostrado la validez de la utilización de *pools* de ADN en los estudios con arrays de metilación.

5.1. Recurrencia vascular y tratamiento antiplaquetario.

Aspirina y clopidogrel, de forma individual o combinada, son el tratamiento de referencia en la prevención secundaria del ictus isquémico (Adams et al. 2008). No obstante, se observa una alta variabilidad interindividual en la respuesta de los pacientes bajo tratamiento antiplaquetario, entre 12-25% de pacientes tratados con aspirina presentan nuevos eventos vasculares (Greer 2010), y entre 5-30% de los que siguen tratamiento con clopidogrel (Markus 2012). El impacto socioeconómico de la resistencia a los antiplaquetarios es elevado, por ello es importante un mayor conocimiento sobre sus causas y de ese modo contribuir a una mejor prevención de nuevos eventos vasculares.

Hemos observado que a pesar de que algunos estudios han identificado un componente genético en la resistencia a los fármacos antiplaquetarios, medida por test bioquímicos, no se ha podido confirmar su asociación con la resistencia clínica o recurrencia vascular (Greer 2010).

Parte del problema radica en la gran variedad de test bioquímicos existentes para evaluar la actividad plaquetaria, y la escasa correlación de los resultados entre los diferentes tipos de medición, dificultando la comparación y validación de resultados entre estudios (Greer 2010). Por otro lado, no se ha llegado a confirmar una relación directa entre actividad plaquetaria y recurrencia vascular. Además es importante tener en cuenta los problemas de seguimiento de los pacientes, la falta de adherencia al tratamiento o los cambios de medicación no reportados durante el seguimiento, creando sesgos en los estudios. A esta problemática se le añade, la posible implicación de factores genéticos en la respuesta al tratamiento, como variantes alélicas raras o variaciones en el número de copias y factores no genéticos como alteraciones epigenéticas. De este modo la falta de una asociación significativa entre los polimorfismos identificados hasta la fecha, asociados con la actividad plaquetaria y la recurrencia vascular, se explicaría por una asociación menor a la inicialmente esperada o por la acción de otros factores genómicos incluyendo los epigenéticos.

Por tanto, para esclarecer estas dudas serán necesarios mejores diseños experimentales, con mayores tamaños muestrales, en los que se evalúe de forma directa la resistencia clínica (recurrencia vascular) junto con el estudio de otros factores genómicos que puedan estar contribuyendo a dicha resistencia.

5.2. Validez de los pools de muestra en estudios basados en arrays de metilación.

Los estudios epigenéticos, sobre todo los que se centran en los niveles de metilación del ADN, están teniendo un gran crecimiento en los últimos años. Esto, junto con el auge de las técnicas 'ómicas', ha hecho de los estudios EWAS unos de los más populares para identificar la influencia de la epigenética en las patologías. El Illumina HumanMethylation450 BeadChip, es hasta la fecha el array de conversión de bisulfito más ampliamente utilizado (Bock 2012), en el que se analizan más 450.000 islas CpG a lo largo del genoma y hasta 12 muestras simultáneas, permitiendo estudios más eficientes desde un punto de vista económico y técnico (Bibikova et al. 2011). Aun así, en ocasiones el precio de estos estudios, sobretodos aquellos con gran número de muestras, sigue siendo elevado, siendo precisas nuevas estrategias para poderlos llevar a cabo. En los estudios GWAS, donde se analizan variantes genéticas en arrays que detectan hasta 2 millones de polimorfismos, la utilización de pools de ADN permite obtener frecuencias alélicas de grupos de individuos e identificar loci asociados a patologías, por una fracción de su precio y una alta fiabilidad (Pearson et al. 2007; Sham et al. 2002).

En nuestro estudio (Gallego-Fabrega et al. 2016) se analizó la validez de los pools de ADN en la determinación de los niveles de metilación realizados mediante arrays de metilación. Tras analizar más de 450.000 islas CpG mediante el 450k BeadChip, se observó que los niveles de metilación (valores α) de los pools mostraban una muy alta correlación ($\rho > 0,99$, $p < 10^{-16}$) con los niveles obtenidos en sus respectivas muestras individuales. Cuando se compararon únicamente las DMC más significativas se mantuvo una alta correlación (Grupo A: $\rho = 0,9808$, $p < 10^{-16}$; Grupo B: $\rho = 0,9872$, $p < 10^{-16}$) de los niveles de metilación (valores β) entre pools y muestras individuales. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Docherty et al., en los que se observó una buena correlación ($\rho = 0,95$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$) entre los niveles de metilación de 84 muestras individuales y 4 pools, en 205 islas CpG distribuidas en 9 regiones diferentes secuenciadas mediante EpiTYPER (Docherty et al. 2009).

Pearson et al. mediante un estudio con pools, identificaron con éxito tres loci en: APOE- $\epsilon 4$, *MAPT* y *TSPYL* previamente asociados con enfermedad de Alzheimer, parálisis supranuclear progresiva y síndrome de muerte súbita del lactante con disgenesia de los testículos, respectivamente (Pearson et al. 2007). Confirmando la validez de esta aproximación para identificar loci con susceptibilidad a enfermedades. En los estudios EWAS todavía no se ha comprobado si la utilización de pools de muestras permite la identificación de DMC asociadas a patologías. De todos modos, la alta correlación de los niveles de metilación obtenidos entre ambos tipos de muestras (individuales y pools) en nuestro estudio, nos indica que muy posiblemente esta estrategia sea eficaz para identificar posibles DMC asociados a patologías.

Es muy importante tener en cuenta, al diseñar un estudio con pools, algunos de los posibles inconvenientes de esta estrategia, para poderlos minimizar en su máxima medida. La cantidad de ADN aportada por cada muestra individual al pool, posibles estratificaciones de la población y el número final de pools son factores cruciales para la obtención de resultados fiables. Es recomendable realizar un estudio en dos fases (descubrimiento mediante pools y validación mediante muestras individuales) para obtener un buen equilibrio entre ahorro e información completa (Sham et al. 2002).

5.3. Hipometilación de TRAF3 y resistencia clínica a clopidogrel.

Existe un elevado número de ejemplos, en donde la variabilidad individual observada en la respuesta a fármacos, que conllevan claras consecuencias fenotípicas en la población, todavía no se ha asociado con alteraciones genéticas (Ingelman-Sundberg and Gomez 2010). Un claro ejemplo es el tratamiento con antiplaquetarios, en donde los SNPs identificados asociados con la actividad plaquetaria en pacientes tratados con aspirina y clopidogrel, no se han asociado con la recurrencia vascular. Se ha postulado que otros factores, al margen de la genética, pueden estar influyendo en esta variabilidad interindividual. La epigenética es un buen ejemplo de factor no genético involucrado en el desarrollo de gran variedad patologías (Portela and Esteller 2010), entre ellas enfermedades cardiovasculares (Voelter-Mahlknecht 2016).

En esta tesis se ha analizado por primera vez la relación entre los niveles de metilación del genoma y la recurrencia vascular en pacientes con ictus isquémico que siguen tratamiento con clopidogrel o con aspirina. Tras analizar el metiloma se identificaron 73 islas diferencialmente metiladas asociadas con la resistencia a clopidogrel y 16 con la resistencia a aspirina. La utilización de estos dos grupos de islas a modo de panel, tenían la capacidad de distinguir entre pacientes que presentaban nuevos eventos vasculares y pacientes que no experimentaban recurrencia. Los resultados de nuestro estudio indican que los paneles de DMC tienen el potencial, para en un futuro, ser utilizados como biomarcadores de resistencia al tratamiento antiplaquetario, no obstante estudios sobre eficacia, sensibilidad, y capacidad de reclasificación son necesarios para evaluar correctamente el potencial como biomarcadores de los niveles de metilación.

En nuestro estudio (Gallego-Fabrega et al. 2016) hemos observado que los niveles de metilación de una isla CpG (cg03548645, $p = 3,33 \times 10^{-05}$) se asocian con la recurrencia vascular en pacientes con ictus tratados con clopidogrel. La isla cg03548645 se localiza en el promotor de *TRAF3*, gen que codifica una proteína de la familia de los factores asociados a los receptores TNF (TRAF). Los miembros de esta familia están implicados en la transducción de señal de CD40 y de los receptores de factores tumorales (*TNFR*) además de tener un papel importante en la activación de la respuesta inmune. Se han observado niveles elevados del ligando CD40 en pacientes con enfermedad cardiovascular (Antoniades et al. 2009; Hassan, Merhi, and Mourad 2012), al igual

DISCUSIÓN

que una asociación entre los niveles de expresión de *TRAF3* y los niveles de CD40 en lesión arterial (Song et al. 2011). Así mismo, Río-Espínola et al. identificaron un polimorfismo en CD40 asociado con la reoclusión después del tratamiento fibrinolítico en la fase aguda del ictus (Río-Espínola et al. 2010).

En un estudio en el que se examinaron los niveles de las proteínas de la familia TRAF en placas ateroscleróticas humanas y modelos murinos, observaron un incremento de los niveles de expresión proteica de TRAF2 y TRAF3 en tejido aterosclerótico en comparación con el tejido sin aterosclerosis. También se observó la relevancia funcional de las proteínas de la familia TRAF en la señalización de la cascada proinflamatoria en células endoteliales. Concretamente el silenciamiento de *TRAF3* mostró mayores niveles de MCP-1, IL-6, IL-8 inducido por CD40 (Zirlik et al. 2007). Por tanto la alteración de *TRAF3* puede permitir la modulación selectiva de las funciones proaterogénicas del ligando CD40 y otras citoquinas proinflamatorias, así mismo Pluvinet et al. remarcan la importancia de la cascada de señalización de CD40 en la intervención terapéutica (Pluvinet et al. 2008).

En nuestro estudio también analizamos los niveles de metilación de las islas CpG a lo largo de *TRAF3* en una serie de 28 pacientes tratados con aspirina y no con clopidogrel. A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metilación de cg03548645 entre el grupo de recurrentes con el de no recurrentes tratados únicamente con aspirina, se observó una hipometilación generalizada de todo el gen en el grupo de pacientes que presentaron recurrencia. Esto nos indica que niveles más bajos de metilación en *TRAF3* pueden estar directamente relacionados con la recurrencia vascular, al margen del tipo de tratamiento antiplaquetario (clopidogrel o aspirina). Sin embargo, estos resultados no se han estudiado en una nueva cohorte de pacientes tratados con aspirina para confirmar esta hipótesis.

Junto a la asociación con la recurrencia vascular en pacientes tratados con clopidogrel, también se han observado una correlación inversa entre la hipometilación de cg03548645 y niveles más elevados de agregación plaquetaria inducida por ADP ($p = 0,0075$). Esta asociación muestra que las alteraciones epigenéticas pueden estar relacionadas en ambos procesos, la recurrencia vascular tras sufrir un ictus y la farmacodinámica del clopidogrel. Queda por determinar en nuevos estudios cual es el papel funcional de la metilación de *TRAF3* y si la asociación con la recurrencia vascular en ictus es debida a un incremento del riesgo aterotrombótico, a la inhibición de la actividad antiplaquetaria o a la combinación de ambos procesos.

5.4. Hipermetilación de PPM1A y resistencia clínica a aspirina.

En nuestro estudio hemos observado que los niveles de metilación elevados en una isla CpG (cg04985020, meta $p = 1,78 \times 10^{-07}$) se asocian con la recurrencia vascular en pacientes con ictus tratados con aspirina. La isla cg04985020 situada en el extremo 3'UTR del gen PPM1A, que codifica la proteína fosfatasa dependiente de magnesio 1A (PPM1A), una enzima con alta especificidad, miembro de la familia PP2C de las proteínas fosfatasas Serina/Treonina. Estas proteínas regulan de forma negativa la vías de respuesta al estrés celular. *PPM1A* concretamente, regula de forma negativa la señalización del factor de crecimiento TGF-beta a través de la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 y la transcripción del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (Lin et al. 2006, 2007; Samarakoon et al. 2011). También regula de forma negativa la actividad de MAP cinasas y se ha observado que inhibe la activación de las cascadas de p38 y JNK cinasa inducidas por el estrés ambiental.

Los niveles PAI-1 se encuentran elevados en varias situaciones clínicas asociadas con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares de tipo isquémico, en particular cuando hay elevados niveles de TGF- β 1 en el tejido (Otsuka 2006; Vaughan 2005, 2006). Así mismo, PAI-1 se ha utilizado como biomarcador en el pronóstico de muerte por causa cardiovascular (Wang et al. 2006). Nuestros resultados indican niveles de metilación más elevados en aquellos pacientes que presentan recurrencia vascular, generalmente asociados con la represión de la expresión génica. Si este fuera el caso, la represión de la expresión de *PPM1A* implicaría la no represión de *PAI-1*, favoreciendo de ese modo nuevos eventos isquémicos. Aún así serán necesarios estudios transcriptómicos para confirmar de qué modo influyen los niveles de metilación de *PPM1A* en la recurrencia vascular.

En la fase de descubrimiento del estudio se observó una asociación entre la isla cg26039762 situada en RAF-1 ($p = 9,69 \times 10^{-06}$) que a pesar de no confirmarse en la fase de validación, si que se pudieron identificar nuevas CpGs muy próximas a esta, que también mostraban metilación diferencial entre pacientes con recurrencia vascular y aquellos sin recurrencia. Tanto la isla cg26039762 como las identificadas posteriormente muestran niveles de metilación más bajos asociados con nuevos eventos vasculares. RAF1 codifica una proteína de la familia de MAP cinasas que actúa activando a otras cinasas implicadas en el control de la expresión génica, la división celular, la apoptosis, la diferenciación celular y la migración celular.

RAF1 se ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades de tipo vascular, tales como demencia vascular, procesos angiogénicos o eventos cardiovasculares (Liu et al. 2014). También se ha descrito su papel en la transducción de señal en la vía TGF- β /SMAD (Watanabe-Takano et al. 2015), al igual que ocurre con *PPM1A*. Además, se ha observado una disminución

DISCUSIÓN

de los niveles de TGF- β 1 en sérum en ratas con hipercolesterolemia a las que se les administraba aspirina (Mohamed, El-Hadidy, and Manna 2014). Cabe destacar que la vía TGF- β /SMAD también está regulada por el gen *CDKN*, el cual se ha asociado anteriormente con: ictus isquémico de tipo aterotrombótico (Traylor et al. 2012), la calcificación arterial (Adams et al. 2016) e infartos de miocardio (Dehghan et al. 2016). Por lo que consideramos que estos resultados, a pesar de no haberse replicado en nuestra población, son interesantes para tener en cuenta en futuros estudios.

A pesar de que la asociación observada entre la recurrencia vascular y los niveles de metilación *PPM1A* y *RAF1*, de forma individual, no es muy elevada, hipotetizamos que una acción conjunta pueden incrementar el riesgo de nuevos eventos isquémicos mediante la regulación de la vía de TGF- β . Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, son necesarios nuevos estudios, con mayores tamaños muestrales, estudios de expresión génica, o análisis genético de estos genes.

En resumen, la farmacoepigénica es un campo en rápido crecimiento, en el que se han descrito diversos mecanismos epigenéticos implicados en la acción y respuesta a los fármacos. Además, se están realizando prometedores avances en el desarrollo de nuevos epifármacos, para el control epigenético de la expresión génica. Los resultados de nuestros estudios evidencian una influencia de las variaciones en los niveles de metilación con la resistencia a los antiplaquetarios, tanto clínica como medida por test bioquímicos. La confirmación de regiones con patrones de metilación alterados en pacientes que presentan nuevos eventos vasculares bajo el tratamiento con antiplaquetarios, puede suponer un paso importante de cara a la utilización de la epigenética como herramienta para encontrar nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores para guiar el tratamiento antiplaquetario (Ivanov, Barragan, and Ingelman-Sundberg 2014).

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

Niveles de metilación alterados pueden contribuir de forma significativa en la variabilidad interindividual observada en la respuesta al tratamiento antiplaquetario en pacientes con ictus isquémico. Se han identificado niveles de metilación alterados asociados con la respuesta a diferentes tratamientos antiplaquetarios.

1. Polimorfismos en los genes *CYP450* y *PEAR1*, principalmente, se han asociado con la actividad plaquetaria en pacientes tratados con clopidogrel y aspirina, respectivamente. Sin embargo, todavía no se ha demostrado una asociación definitiva entre estos polimorfismos y la recurrencia vascular. Otros factores, al margen de la genética, pueden estar mediando en la respuesta al tratamiento antiplaquetario.
2. Existe una correlación muy elevada entre los niveles de metilación obtenidos en muestras individuales y los obtenidos en *pools*, mediante la plataforma Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. Estudios EWAS, siguiendo esta estrategia, pueden ser utilizados para reducir costes en la fase de descubrimiento, o en ocasiones en las que haya poco ADN disponible.
3. La hipometilación de la isla cg03548645 situada en la región promotora de *TRAF3*, se asocia con nuevos eventos vasculares en aquellos pacientes con ictus isquémico tratados con clopidogrel. A su vez, se asocia con mayores niveles de agregación plaquetaria medida mediante Light Transmission Aggregometry.
4. La hipermetilación de la isla cg04985020 situada en el gen *PPM1A*, se asocia con nuevos eventos vasculares en aquellos pacientes con ictus isquémico tratados con aspirina.

A decorative vertical line on the right side of the page, consisting of a thin grey line with small red dots. Six circular images of the moon are arranged vertically, each with a small orange starburst next to it.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams, H. et al. 1993. "Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke." *Stroke* 23(1):35–41.
- Adams, Hieab H. H. et al. 2016. "Heritability and Genome-Wide Association Analyses of Intracranial Carotid Artery Calcification: The Rotterdam Study." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 47(4):912–17.
- Adams, Robert J. et al. 2008. "Update to the AHA/ASA Recommendations for the Prevention of Stroke in Patients with Stroke and Transient Ischemic Attack." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39(5):1647–52.
- Albers, Gregory W., Pierre Amarenco, J. Donald Easton, Ralph L. Sacco, and Philip Teal. 2004. "Antithrombotic and Thrombolytic Therapy for Ischemic Stroke: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy." *Chest* 126(3 Suppl):483S – 512S.
- Amir, R. E. et al. 1999. "Rett Syndrome Is Caused by Mutations in X-Linked MECP2, Encoding Methyl-CpG-Binding Protein 2." *Nature genetics* 23(2):185–88.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration. 2002. "Collaborative Meta-Analysis of Randomised Trials of Antiplatelet Therapy for Prevention of Death, Myocardial Infarction, and Stroke in High Risk Patients." *BMJ (Clinical research ed.)* 324(7329):71–86.
- Antoniades, Charalambos, Constantinos Bakogiannis, Dimitris Tousoulis, Alexios S. Antonopoulos, and Christodoulos Stefanadis. 2009. "The CD40/CD40 Ligand System: Linking Inflammation with Atherothrombosis." *Journal of the American College of Cardiology* 54(8):669–77.
- Arsava, E. M. et al. 2010. "The Causative Classification of Stroke System: An International Reliability and Optimization Study." *Neurology* 75(14):1277–84.
- Badimon, Lina, Guiomar Mendieta, and Gemma Vilahur. 2014. "Diferencias en los mecanismos de acción de los nuevos antiagregantes: ¿cómo actúan?" *Revista Española de Cardiología Suplementos* 14(Supl.A):3–9.
- Badimon, Lina, and Gemma Vilahur. 2013. "Mecanismos de acción de los diferentes agentes antiplaquetarios." *Revista Española de Cardiología Suplementos* 13(Supl.B):8–15.
- Bannister, Andrew J., and Tony Kouzarides. 2011. "Regulation of Chromatin by Histone Modifications." *Cell research* 21(3):381–95.
- Barnes, Geoffrey D. et al. 2007. "Dual Antiplatelet Agent Failure: A New Syndrome or Clinical Nonentity?" *American heart journal* 154(4):732–35.
- Beck, S., a Olek, and J. Walter. 1999. "From Genomics to Epigenomics: A Loftier View of Life." *Nature biotechnology* 17(12):1144.
- Bellenguez, Céline et al. 2012. "Genome-Wide Association Study Identifies a Variant in HDAC9 Associated with Large Vessel Ischemic Stroke." *Nature Genetics* 44(3):328–33.
- Berger, S. L., T. Kouzarides, R. Shiekhattar, and A. Shilatifard. 2009. "An Operational Definition of Epigenetics." *Genes & Development* 23(7):781–83.
- Bevan, Steve et al. 2012. "Genetic Heritability of Ischemic Stroke and the Contribution of Previously Reported Candidate Gene and Genomewide Associations." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 43(12):3161–67.
- Bibikova, Marina et al. 2011. "High Density DNA Methylation Array with Single CpG Site Resolution." *Genomics* 98(4):288–95.
- Biffi, Alessandro et al. 2010. "Variants at APOE Influence Risk of Deep and Lobar Intracerebral Hemorrhage." *Annals of neurology* 68(6):934–43.
- Bock, Christoph. 2012. "Analysing and Interpreting DNA Methylation Data." *Nature Reviews Genetics*

BIBLIOGRAFÍA

- 13(10):705–19.
- Born, Gustav, and Carlo Patrono. 2006. “Antiplatelet Drugs.” *British journal of pharmacology* 147 Suppl :S241–51.
- Burn, J. et al. 1994. “Long-Term Risk of Recurrent Stroke after a First-Ever Stroke. The Oxfordshire Community Stroke Project.” *Stroke; a journal of cerebral circulation* 25(2):333–37.
- CAPRIE Steering Committee. 1996. “A Randomised, Blinded, Trial of Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events (CAPRIE).” *Lancet (London, England)* 348(9038):1329–39.
- Di Carlo, Antonio. 2009. “Human and Economic Burden of Stroke.” *Age and Ageing* 38(1):4–5.
- Consortium, Roadmap Epigenomics et al. 2015. “Integrative Analysis of 111 Reference Human Epigenomes.” *Nature* 518(7539):317–30.
- Cui, Hanbin et al. 2015. “Correlation Between SNPs in Candidate Genes and VerifyNow-Detected Platelet Responsiveness to Aspirin and Clopidogrel Treatment.” *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 29(2):137–46.
- Day, Kenneth et al. 2013. “Differential DNA Methylation with Age Displays Both Common and Dynamic Features across Human Tissues That Are Influenced by CpG Landscape.” *Genome biology* 14(9):R102.
- Dehghan, Abbas et al. 2016. “Genome-Wide Association Study for Incident Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease in Prospective Cohort Studies: The CHARGE Consortium.” *PloS one* 11(3):e0144997.
- Díaz-Guzmán, Jaime et al. 2012. “Stroke and Transient Ischemic Attack Incidence Rate in Spain: The IBERICTUS Study.” *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 34(4):272–81.
- Diener, Hans-Christoph et al. 2008. “Effects of Aspirin plus Extended-Release Dipyridamole versus Clopidogrel and Telmisartan on Disability and Cognitive Function after Recurrent Stroke in Patients with Ischaemic Stroke in the Prevention Regimen for Effectively Avoiding Second Strokes (PRoFE).” *The Lancet. Neurology* 7(10):875–84.
- Docherty, Sophia J., Oliver S. P. Davis, Claire M. A. Haworth, Robert Plomin, and Jonathan Mill. 2009. “Bisulfite-Based Epityping on Pooled Genomic DNA Provides an Accurate Estimate of Average Group DNA Methylation.” *Epigenetics & chromatin* 2(1):3.
- Feher, Gergely et al. 2010. “Clinical Importance of Aspirin and Clopidogrel Resistance.” *World journal of cardiology* 2(7):171–86.
- Feinberg, Andrew P. 2010. “Genome-Scale Approaches to the Epigenetics of Common Human Disease.” *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 456(1):13–21.
- Feinberg, Andrew P., and Benjamin Tycko. 2004. “The History of Cancer Epigenetics.” *Nature reviews. Cancer* 4(2):143–53.
- Flossmann, Enrico, Ursula G. R. Schulz, and Peter M. Rothwell. 2004. “Systematic Review of Methods and Results of Studies of the Genetic Epidemiology of Ischemic Stroke.” *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35(1):212–27.
- Gaj, Pawel et al. 2012. “Pooled Sample-Based GWAS: A Cost-Effective Alternative for Identifying Colorectal and Prostate Cancer Risk Variants in the Polish Population.” edited by Kin Mang Lau. *PloS one* 7(4):e35307.
- Gallego-Fabrega, Cristina et al. 2016. “TRAF3 Epigenetic Regulation Is Associated with Vascular Recurrence in Ischemic Stroke Patients.” *Stroke*.
- Goldberg, Aaron D., C. David Allis, and Emily Bernstein. 2007. “Epigenetics: A Landscape Takes Shape.” *Cell* 128(4):635–38.
- Gomez-Uriz, A. M. et al. 2015. “Obesity and Ischemic Stroke Modulate the Methylation Levels of

- KCNQ1 in White Blood Cells.” *Human Molecular Genetics* 24(5):1432–40.
- Goodman, Timothy, Albert Ferro, and Pankaj Sharma. 2008. “Pharmacogenetics of Aspirin Resistance: A Comprehensive Systematic Review.” *British journal of clinical pharmacology* 66(2):222–32.
- Greer, David M. 2010. “Aspirin and Antiplatelet Agent Resistance: Implications for Prevention of Secondary Stroke.” *CNS Drugs* 24(12):1027–40.
- Halushka, Marc K., Linda P. Walker, and Perry V. Halushka. 2003. “Genetic Variation in Cyclooxygenase 1: Effects on Response to Aspirin.” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 73(1):122–30.
- Häsler, Robert et al. 2012. “A Functional Methylome Map of Ulcerative Colitis.” *Genome research* 22(11):2130–37.
- Hassan, Ghada S., Yahye Merhi, and Walid Mourad. 2012. “CD40 Ligand: A Neo-Inflammatory Molecule in Vascular Diseases.” *Immunobiology* 217(5):521–32.
- Helgadottir, A. et al. 2007. “A Common Variant on Chromosome 9p21 Affects the Risk of Myocardial Infarction.” *Science* 316(5830):1491–93.
- Herrera-Galeano, J. Enrique et al. 2008. “A Novel Variant in the Platelet Endothelial Aggregation Receptor-1 Gene Is Associated with Increased Platelet Aggregability.” *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28(8):1484–90.
- Heuschmann, Peter U. et al. 2009. “Incidence of Stroke in Europe at the Beginning of the 21st Century.” *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40(5):1557–63.
- Hillen, Thomas et al. 2003. “Cause of Stroke Recurrence Is Multifactorial: Patterns, Risk Factors, and Outcomes of Stroke Recurrence in the South London Stroke Register.” *Stroke* 34(6):1457–63.
- Holmes, David R. et al. 2010. “ACCF/AHA Clopidogrel Clinical Alert: Approaches to the FDA ‘boxed Warning’: A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the American Heart Association Endorsed by the Society for Cardiova.” *Journal of the American College of Cardiology* 56(4):321–41.
- Holmes, Michael V, Pablo Perel, Tina Shah, Aroon D. Hingorani, and Juan P. Casas. 2011. “CYP2C19 Genotype, Clopidogrel Metabolism, Platelet Function, and Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *JAMA* 306(24):2704–14.
- Hong, Keun-Sik. 2014. “Dual Antiplatelet Therapy after Noncardioembolic Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack: Pros and Cons.” *Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)* 10(3):189–96.
- Hsieh, Yi-Chen et al. 2012. “Association between Genetic Variant on Chromosome 12p13 and Stroke Survival and Recurrence: A One Year Prospective Study in Taiwan.” *Journal of biomedical science* 19:1.
- Ikegame, Tempei et al. 2013. “DNA Methylation of the BDNF Gene and Its Relevance to Psychiatric Disorders.” *Journal of human genetics* 58(7):434–38.
- Ingelman-Sundberg, Magnus, and Alvin Gomez. 2010. “The Past , Present and Future of Pharmacogenomics.” *Pharmacogenomics* 11(5):625–27.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. “Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome.” *Nature* 431(7011):931–45.
- Ivanov, Maxim, Isabel Barragan, and Magnus Ingelman-Sundberg. 2014. “Epigenetic Mechanisms of Importance for Drug Treatment.” *Trends in pharmacological sciences* 35(8):384–96.
- Johnson, Adiv A. et al. 2012. “The Role of DNA Methylation in Aging, Rejuvenation, and Age-Related Disease.” *Rejuvenation research* 15(5):483–94.
- Johnson, Andrew D. et al. 2010. “Genome-Wide Meta-Analyses Identifies Seven Loci Associated with Platelet Aggregation in Response to Agonists.” *Nature genetics* 42(7):608–13.

BIBLIOGRAFÍA

- Kernan, W. N. et al. 2000. "The Stroke Prognosis Instrument II (SPI-II): A Clinical Prediction Instrument for Patients with Transient Ischemia and Nondisabling Ischemic Stroke." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 31(2):456–62.
- Kernan, Walter N. et al. 2014. "Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients with Stroke and Transient Ischemic Attack: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 45(7):2160–2236.
- Kim, Jae-Min et al. 2012. "Associations of BDNF Genotype and Promoter Methylation with Acute and Long-Term Stroke Outcomes in an East Asian Cohort." *PloS one* 7(12):e51280.
- Lansberg, Maarten G. et al. 2012. "Antithrombotic and Thrombolytic Therapy for Ischemic Stroke: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines." *Chest* 141(2 Suppl):e601S – 36S.
- Lewis, Joshua P. et al. 2013. "Genetic Variation in PEAR1 Is Associated with Platelet Aggregation and Cardiovascular Outcomes." *Circulation. Cardiovascular genetics* 6(2):184–92.
- Lin, Xia et al. 2006. "PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGF β Signaling." *Cell* 125(5):915–28.
- Lin, Xia, Yeguang Chen, Anming Meng, and Xinhua Feng. 2007. "Termination of TGF-Beta Superfamily Signaling Through SMAD Dephosphorylation-A Functional Genomic View." *Journal of Genetics and Genomics* 34(1):1–9.
- Liu, Zhiguo et al. 2014. "MiR-7-5p Is Frequently Downregulated in Glioblastoma Microvasculature and Inhibits Vascular Endothelial Cell Proliferation by Targeting RAF1." *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35(10):10177–84.
- Lloyd-Jones, Donald et al. 2009. "Heart Disease and Stroke Statistics--2009 Update: A Report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." *Circulation* 119(3):480–86.
- Lohmueller, Kirk E., Celeste L. Pearce, Malcolm Pike, Eric S. Lander, and Joel N. Hirschhorn. 2003. "Meta-Analysis of Genetic Association Studies Supports a Contribution of Common Variants to Susceptibility to Common Disease." *Nature genetics* 33(2):177–82.
- Lovett, J. K., A. J. Coull, and P. M. Rothwell. 2004. "Early Risk of Recurrence by Subtype of Ischemic Stroke in Population-Based Incidence Studies." *Neurology* 62(4):569–73.
- Malik, Rainer et al. 2016. "Low-Frequency and Common Genetic Variation in Ischemic Stroke: The METASTROKE Collaboration." *Neurology* (86):1–10.
- Markus, Hugh S. 2012. "Stroke Genetics: Prospects for Personalized Medicine." *BMC medicine* 10:113.
- Markus, Hugh S. et al. 2013. "Evidence HDAC9 Genetic Variant Associated with Ischemic Stroke Increases Risk via Promoting Carotid Atherosclerosis." *Stroke; a journal of cerebral circulation* 44(5):1220–25.
- Mason, Peter J., Alice K. Jacobs, and Jane E. Freedman. 2005. "Aspirin Resistance and Atherothrombotic Disease." *Journal of the American College of Cardiology* 46(6):986–93.
- McPherson, Ruth et al. 2007. "A Common Allele on Chromosome 9 Associated with Coronary Heart Disease." *Science (New York, N.Y.)* 316(5830):1488–91.
- Medrano Alberto, M. José, Raquel Boix Martínez, Elena Cerrato Crespán, and Margarita Ramírez Santa-Pau. 2006. "Incidence and Prevalence of Ischaemic Heart Disease and Cerebrovascular Disease in Spain: A Systematic Review of the Literature." *Revista española de salud pública* 80(1):5–15.
- Mega, Jessica L. et al. 2009. "Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel." *N Engl J Med* 360(4):354–62.

- Meschia, James F. et al. 2014. *Guidelines for the Primary Prevention of Stroke: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association.*
- Mohamed, Adham R., Wessam F. El-Hadidy, and Hazem F. Mannaa. 2014. "Assessment of the Prophylactic Role of Aspirin And/or Clopidogrel on Experimentally Induced Acute Myocardial Infarction in Hypercholesterolemic Rats." *Drugs in R&D* 14(4):233–39.
- Mozaffarian, Dariush et al. 2015. "Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update A Report From the American Heart Association." *Circulation.*
- Müller, C., H. J. Büttner, J. Petersen, and H. Roskamm. 2000. "A Randomized Comparison of Clopidogrel and Aspirin versus Ticlopidine and Aspirin after the Placement of Coronary-Artery Stents." *Circulation* 101(6):590–93.
- NINDS Stroke Genetics Network (SiGN), International Stroke Genetics Consortium (ISGC). 2015. "Loci Associated with Ischaemic Stroke and Its Subtypes (SiGN): A Genome-Wide Association Study." *The Lancet. Neurology* 15(February):4–7.
- Nissen, Steven E. 2011. "Pharmacogenomics and Clopidogrel: Irrational Exuberance?" *JAMA* 306(24):2727–28.
- Otsuka, G. 2006. "Transforming Growth Factor Beta 1 Induces Neointima Formation Through Plasminogen Activator Inhibitor-1-Dependent Pathways." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26(4):737–43.
- Palazzo, Alexander F., and Eliza S. Lee. 2015. "Non-Coding RNA: What Is Functional and What Is Junk?" *Frontiers in Genetics* 6:2.
- Patrono, Carlo, Barry Collier, Garret a. FitzGerald, Jack Hirsh, and Gerald Roth. 2004. "Platelet-Active Drugs: The Relationships among Dose, Effectiveness, and Side Effects - The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy." *Chest* 126(3 SUPPL.).
- Paul, Bidisha et al. 2015. "Influences of Diet and the Gut Microbiome on Epigenetic Modulation in Cancer and Other Diseases." *Clinical epigenetics* 7:112.
- Pearson, John V et al. 2007. "Identification of the Genetic Basis for Complex Disorders by Use of Pooling-Based Genomewide Single-Nucleotide-Polymorphism Association Studies." *American journal of human genetics* 80(1):126–39.
- Pluvinet, Raquel et al. 2008. "CD40: An Upstream Master Switch for Endothelial Cell Activation Uncovered by RNAi-Coupled Transcriptional Profiling." *Blood* 112(9):3624–37.
- Portela, A., and M. Esteller. 2010. "Epigenetic Modifications and Human Disease." *Nat Biotechnol* 28(10):1057–68.
- Qayyum, Rehan et al. 2015. "Genome-Wide Association Study of Platelet Aggregation in African Americans." *BMC genetics* 16:58.
- Radman-Livaja, Marta, and Oliver J. Rando. 2010. "Nucleosome Positioning: How Is It Established, and Why Does It Matter?" *Developmental Biology* 339(2):258–66.
- Río-Espínola, Alberto del et al. 2010. "CD40 -1C>T Polymorphism (rs1883832) Is Associated with Brain Vessel Reocclusion after Fibrinolysis in Ischemic Stroke." *Pharmacogenomics* 11(6):763–72.
- Sacco, R. L., T. Shi, M. C. Zamanillo, and D. E. Kargman. 1994. "Predictors of Mortality and Recurrence after Hospitalized Cerebral Infarction in an Urban Community: The Northern Manhattan Stroke Study." *Neurology* 44(4):626–34.
- Samarakoon, Rohan et al. 2011. "Redox-Induced Src Kinase and Caveolin-1 Signaling in TGF- β 1-Initiated SMAD2/3 Activation and PAI-1 Expression" edited by James Keen. *PLoS ONE* 6(7):e22896.
- Schulz, U. G. R., E. Flossmann, and P. M. Rothwell. 2004. "Heritability of Ischemic Stroke in Relation to

BIBLIOGRAFÍA

- Age, Vascular Risk Factors, and Subtypes of Incident Stroke in Population-Based Studies.” *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35(4):819–24.
- Scott, S. A. et al. 2013. “Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 Update.” *Clinical pharmacology and therapeutics* 94(3):317–23.
- Serena, Joaquín, Tomás Segura, Jaume Roquer, María García-Gil, and José Castillo. 2015. “The ARTICO Study: Identification of Patients at High Risk of Vascular Recurrence after a First Non-Cardioembolic Stroke.” *BMC neurology* 15:28.
- Sham, Pak, Joel S. Bader, Ian Craig, Michael O’Donovan, and Michael Owen. 2002. “DNA Pooling: A Tool for Large-Scale Association Studies.” *Nature reviews. Genetics* 3(11):862–71.
- Shenker, Natalie S. et al. 2013. “DNA Methylation as a Long-Term Biomarker of Exposure to Tobacco Smoke.” *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 24(5):712–16.
- Shuldiner, Alan R. et al. 2009. “Association of Cytochrome P450 2C19 Genotype with the Antiplatelet Effect and Clinical Efficacy of Clopidogrel Therapy.” *JAMA* 302(8):849–57.
- Simon, Tabassome et al. 2009. “Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events.” *The New England journal of medicine* 360(4):363–75.
- Snoep, Jaapjan D. et al. 2007. “Clopidogrel Nonresponsiveness in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention with Stenting: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *American heart journal* 154(2):221–31.
- Song, Zifang et al. 2011. “CD40 Is Essential in the Upregulation of TRAF Proteins and NF-kappaB-Dependent Proinflammatory Gene Expression after Arterial Injury.” *PloS one* 6(8):e23239.
- Soriano-Tárraga, Carolina et al. 2015. “Epigenome-Wide Association Study Identifies TXNIP Gene Associated with Type 2 Diabetes Mellitus and Sustained Hyperglycemia.” *Human molecular genetics* (December):1–11.
- Su, Jia et al. 2014. “Association of P2Y12 Gene Promoter DNA Methylation with the Risk of Clopidogrel Resistance in Coronary Artery Disease Patients.” *BioMed research international* 2014:450814.
- Tendera, Michał, and Wojciech Wojakowski. 2003. “Role of Antiplatelet Drugs in the Prevention of Cardiovascular Events.” *Thrombosis Research* 110(5-6):355–59.
- Thorvaldsen, P., K. Asplund, K. Kuulasmaa, A. M. Rajakangas, and M. Schroll. 1995. “Stroke Incidence, Case Fatality, and Mortality in the WHO MONICA Project. World Health Organization Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease.” *Stroke; a journal of cerebral circulation* 26(3):361–67.
- Touzé, Emmanuel, and Peter M. Rothwell. 2008. “Sex Differences in Heritability of Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39(1):16–23.
- Traylor, Matthew et al. 2012. “Genetic Risk Factors for Ischaemic Stroke and Its Subtypes (the METASTROKE Collaboration): A Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies.” *The Lancet. Neurology* 11(11):951–62.
- Truelsen, T. et al. 2006. “Stroke Incidence and Prevalence in Europe: A Review of Available Data.” *European Journal of Neurology* 13(6):581–98.
- Vaughan, Douglas E. 2005. “PAI-1 and Atherothrombosis.” *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3(8):1879–83.
- Vaughan, Douglas E. 2006. “PAI-1 and TGF-Beta: Unmasking the Real Driver of TGF-Beta-Induced Vascular Pathology.” *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26(4):679–80.
- Verma, Mukesh. 2012. “Epigenome-Wide Association Studies (EWAS) in Cancer.” *Current genomics* 13(4):308–13.

- Verschuren, Jeffrey J. W. et al. 2012. "A Systematic Review on Pharmacogenetics in Cardiovascular Disease: Is It Ready for Clinical Application?" *European heart journal* 33(2):165–75.
- Voelker-Mahlknecht, Susanne. 2016. "Epigenetic Associations in Relation to Cardiovascular Prevention and Therapeutics." *Clinical Epigenetics* 8(1):4.
- Voorra, Deepak, John Horton, Svati H. Shah, Linda K. Shaw, and L. Kristin Newby. 2011. "Polymorphisms Associated with in Vitro Aspirin Resistance Are Not Associated with Clinical Outcomes in Patients with Coronary Artery Disease Who Report Regular Aspirin Use." *American heart journal* 162(1):166–72.e1.
- Wang, Thomas J. et al. 2006. "Multiple Biomarkers for the Prediction of First Major Cardiovascular Events and Death." *The New England journal of medicine* 355(25):2631–39.
- Washietl, Stefan et al. 2007. "Structured RNAs in the ENCODE Selected Regions of the Human Genome." *Genome research* 17(6):852–64.
- Watanabe-Takano, Haruko, Kazunori Takano, Masahiko Hatano, Takeshi Tokuhisa, and Takeshi Endo. 2015. "DA-Raf-Mediated Suppression of the Ras-ERK Pathway Is Essential for TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Type 2 Cells." *PloS one* 10(5):e0127888.
- Weber, Ralph, and Hans-Christoph Diener. 2010. "Controversies and Future Perspectives of Antiplatelet Therapy in Secondary Stroke Prevention." *Journal of cellular and molecular medicine* 14(10):2371–80.
- Weimar, C. et al. 2008. "Predictive Value of the Essen Stroke Risk Score and Ankle Brachial Index in Acute Ischaemic Stroke Patients from 85 German Stroke Units." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79(12):1339–43.
- Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC). 2007. "Genome-Wide Association Study of 14,000 Cases of Seven Common Diseases and 3,000 Shared Controls." *Nature* 447(7145):661–78.
- Van Wijk, I. et al. 2005. "Long-Term Survival and Vascular Event Risk after Transient Ischaemic Attack or Minor Ischaemic Stroke: A Cohort Study." *Lancet* 365(9477):2098–2104.
- Williams, Frances M. K. et al. 2013. "Ischemic Stroke Is Associated with the ABO Locus: The EuroCLOT Study." *Annals of neurology* 73(1):16–31.
- Williams, Stephen R. et al. 2016. "Shared Genetic Susceptibility of Vascular-Related Biomarkers with Ischemic and Recurrent Stroke." *Neurology* 86(4):351–59.
- Woo, Daniel et al. 2014. "Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies Identifies 1q22 as a Susceptibility Locus for Intracerebral Hemorrhage." *American journal of human genetics* 94(4):511–21.
- Würtz, Morten, Peter H. Nissen, Erik Lerkevang Grove, Steen Dalby Kristensen, and Anne-Mette Hvas. 2014. "Genetic Determinants of on-Aspirin Platelet Reactivity: Focus on the Influence of PEAR1." *PloS one* 9(10):e111816.
- Xu, Xiaojing et al. 2013. "A Genome-Wide Methylation Study on Obesity: Differential Variability and Differential Methylation." *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society* 8(5):522–33.
- Yin, Tong, and Toshiyuki Miyata. 2011. "Pharmacogenomics of Clopidogrel: Evidence and Perspectives." *Thrombosis research* 128(4):307–16.
- Zaina, Silvio et al. 2014. *DNA Methylation Map of Human Atherosclerosis*.
- Zaina, Silvio et al. 2015. "DNA Methylation Dynamics in Human Carotid Plaques after Cerebrovascular Events." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35(8):1835–42.
- Zhang, Z. et al. 2014. "Chromosome 12p13 Variants Predict Recurrence of Ischaemic Stroke in a Chinese Population." *European journal of neurology* 21(11):1400–1405.

BIBLIOGRAFÍA

Zirlik, Andreas et al. 2007. "TRAF-1, -2, -3, -5, and -6 Are Induced in Atherosclerotic Plaques and Differentially Mediate Proinflammatory Functions of CD40L in Endothelial Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(5):1101–7.

ANEXO



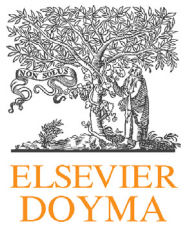
8.1. ARTÍCULO 4

La resistencia en el tratamiento secundario del ictus isquémico, el componente genético en la respuesta a ácido acetilsalicílico y clopidogrel

Gallego-Fabrega C, Krupinski J, Fernandez-Cadenas I.

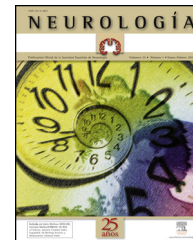
* en nombre de Genestroke Consortium, Consorcio Español para el Estudio Genético del Ictus

Neurología 2014 Mar (9):566-73



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



REVISIÓN

La resistencia en el tratamiento secundario del ictus isquémico, el componente genético en la respuesta a ácido acetilsalicílico y clopidogrel

C. Gallego-Fabrega^a, J. Krupinski^{b,c} e I. Fernandez-Cadenas^{a,*}

en nombre de Genestroke Consortium, Consorcio Español para el Estudio Genético del Ictus

^a Laboratorio de Genética y Farmacogenómica Neurovascular, Fundació Docència i Recerca Mútua Terrassa, Terrassa, Barcelona, España

^b Servicio de Neurología, Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa, Barcelona, España

^c School of Healthcare Science, Manchester Metropolitan University, Manchester, Inglaterra

Recibido el 16 de julio de 2013; aceptado el 28 de noviembre de 2013

PALABRAS CLAVE

Ictus;
Ácido acetilsalicílico;
Clopidogrel;
Antiagregantes;
Resistencia;
Farmacogenética

Resumen

Introducción: Las enfermedades cerebrovasculares están entre las principales causas de mortalidad y discapacidad en los países desarrollados. El ácido acetilsalicílico (AAS) y el clopidogrel son los tratamientos antiagregantes plaquetarios más utilizados para la profilaxis de nuevos eventos tromboembólicos. Sin embargo, se han observado casos en los que el tratamiento antiagregante no inhibe la actividad plaquetaria, un fenómeno llamado resistencia y que posiblemente puede estar modulado a nivel genético.

Desarrollo: Tras una búsqueda bibliográfica se realizó una revisión sobre el estado actual del tratamiento antiagregante plaquetario. Se tratan los diferentes tipos de resistencia a la terapia antiagregante, de qué manera se mide, la problemática y limitaciones actuales, así como los factores genéticos que se han asociado a esta resistencia. Principalmente se analizan los estudios genéticos realizados en el campo de la resistencia a AAS y clopidogrel mediante Genome Wide Association.

Conclusiones: Parece existir una asociación entre diferentes factores genéticos y la resistencia a los fármacos antiagregantes medida mediante la actividad plaquetaria; no obstante, no hay una asociación evidente entre estos factores genéticos y el riesgo de nuevos eventos tromboembólicos.

© 2013 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: israelcadenas@yahoo.es (I. Fernandez-Cadenas).

KEYWORDS

Stroke;
Acetylsalicylic acid;
Clopidogrel;
Antiplatelet drugs;
Resistance;
Pharmacogenetics

Drug resistance and secondary treatment of ischaemic stroke: The genetic component of the response to acetylsalicylic acid and clopidogrel

Abstract

Introduction: Cerebrovascular diseases are among the leading causes of death and disability in developed countries. Acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel are the most widely-used antiplatelet drugs for secondary prevention of recurrent thromboembolic events. However, there have been cases in which antiplatelet drugs did not inhibit platelet activity; this phenomenon is called resistance, and it may be modulated at the genetic level.

Development: Following a literature search, we reviewed the current state of antiplatelet therapy and covered the different types of resistance to antiplatelet therapy, how it is measured, current problems and limitations, and any genetic factors that have been associated with resistance. We mainly used the Genome Wide Association Studies in the field of ASA and clopidogrel resistance.

Conclusions: We observed an association between different genetic factors and antiplatelet drug resistance as measured by platelet activity. However, there is no evident association between these genetic factors and risk of new thromboembolic events.

© 2013 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El ictus o enfermedad cerebrovascular, con 6,2 millones de defunciones en 2008, es la segunda causa de mortalidad en el mundo y la primera causa de discapacidad en los países desarrollados, con una media de 200 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año¹.

Tras un primer ictus, el riesgo acumulativo de presentar un nuevo evento vascular (recurrencia) es del 11,1% el primer año, el 26,4% durante los siguientes 5 años y 39,2% a los 10 años². Por subtipos, el riesgo de recurrencia es mayor en los ictus de origen aterotrombótico y cardioembólico, y menor en el lacunar³. Las plaquetas tienen un papel principal en la formación de trombos, pudiendo ser activadas por varios factores, entre ellos, la serotonina, la epinefrina, la adenosina difosfato (ADP) y el tromboxano A2. Los fármacos antitrombóticos y antiagregantes plaquetarios son uno de los tipos de fármacos utilizados en la prevención secundaria del ictus isquémico para tratar de evitar nuevos episodios vasculares⁴. El tratamiento antiagregante, sobre todo ácido acetil salicílico (AAS) y clopidogrel, es el más recomendado para la prevención secundaria del ictus isquémico. La excepción es el ictus isquémico de tipo cardioembólico tratado con anticoagulantes siempre que este tipo de pacientes no tengan riesgo de presentar hemorragias³.

A pesar de los claros beneficios demostrados por los tratamientos antiagregantes, la reactividad plaquetaria es variable y los pacientes no responden de manera uniforme a esta terapia. Se ha observado que la reducción del riesgo obtenida con estos fármacos no es la óptima. Por ejemplo, la mortalidad de los pacientes se ve reducida únicamente en un 18%, mientras que la discapacidad se reduce en un 25%. De hecho, entre un 10-20%⁵ de los pacientes tratados con AAS o clopidogrel experimentan nuevos eventos vasculares. Este fenómeno puede ser debido a una resistencia al medicamento por parte del paciente. Esta resistencia se define como una actividad plaquetaria normal a pesar de un correcto tratamiento antiagregante. Diferentes estrategias se han realizado para mejorar los índices de recurrencia

vascular con combinaciones de fármacos, sin los resultados esperados⁶⁻⁸.

En esta revisión comentaremos los estudios genéticos que se han realizado en el campo de la resistencia a antiagregantes y la dificultad y la problemática de relacionar la resistencia medida mediante la actividad plaquetaria con la aparición de nuevos eventos vasculares.

Desarrollo

Realizamos una búsqueda bibliográfica en PubMed y Google académico con las palabras clave: «stroke», «aspirin», «clopidogrel», «antiplatelet therapy», «resistance», «genetics» y «pharmacogenomics». Se tuvieron en cuenta solo artículos científicos indexados en revistas científicas; entre ellos, se seleccionaron tanto artículos originales como revisiones, publicados en inglés o español.

Las vías metabólicas del ácido acetilsalicílico y clopidogrel

El efecto antiagregante del AAS se consigue a través de la inhibición permanente de la enzima ciclooxigenasa (COX)⁶. La enzima COX tiene 2 isoformas diferentes, COX-1 enzima constitutiva presente en la mayoría las células, y COX-2, que se expresa frente a estímulos inflamatorios. La AAS inhibe de forma irreversible COX-1, bloqueando la conversión del ácido araquidónico a tromboxano A2 (fig. 1); de esta manera, se bloquea el desencadenante principal de la activación plaquetaria⁶.

En cambio, el clopidogrel es un profármaco que necesita ser metabolizado en el hígado para convertirse en un metabolito activo (tiolactona) con actividad antiagregante. Este proceso consta de 2 pasos de oxidación y es mediado por varias enzimas hepáticas del citocromo P450 (CYP) (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4/5). El efecto antitrombótico del clopidogrel se debe a la unión irreversible de la tiolactona al receptor de ADP (P2Y₁₂) de la superficie plaquetaria⁷ (fig. 1).

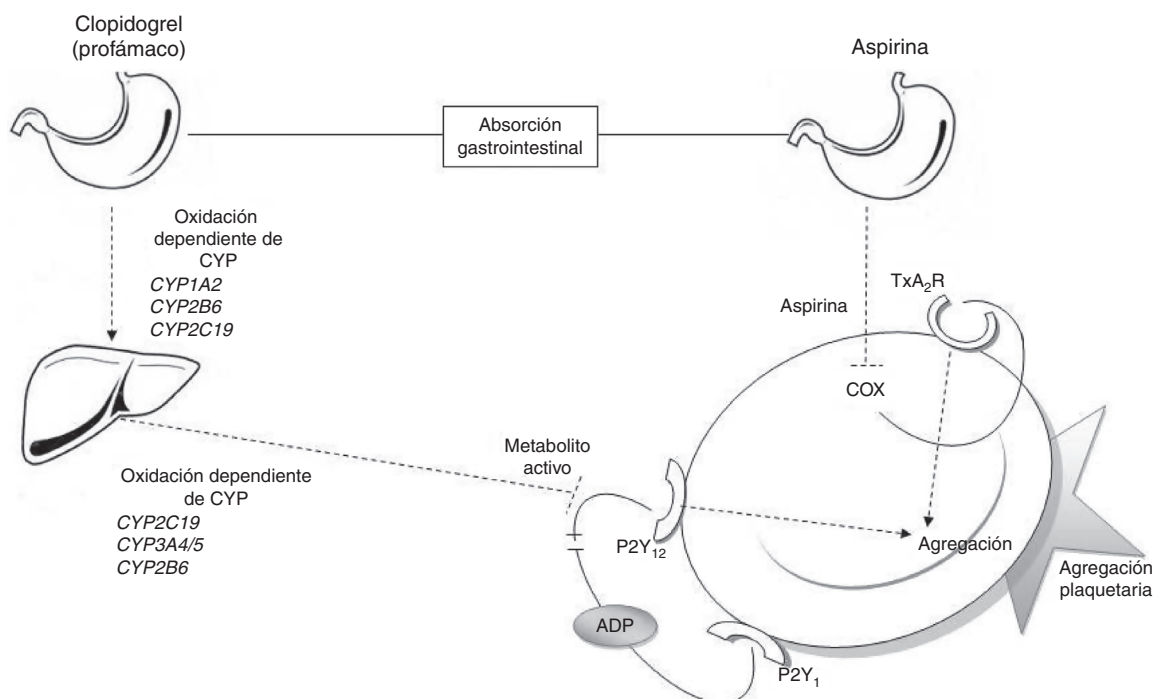


Figura 1 Relación entre antiagregantes y agregación plaquetaria. Metabolismo del clopidogrel: el clopidogrel es metabolizado en el hígado mediante 2 etapas de oxidación en las que se ven envueltas diversas enzimas del CYP. El metabolito activo inhibe la unión de la adenina disulfato (ADP) al receptor P2Y₁₂ bloqueando la agregación plaquetaria. Metabolismo de la AAS: la AAS es absorbida de forma gastrointestinal, en las plaquetas inhibe a COX y la generación de tromboxano, bloqueando la agregación plaquetaria. ADP: adenosín difosfato; COX: ciclooxigenasa; CYP: citocromo P450; TxA₂R: receptor de tromboxano A₂.

La resistencia a ácido acetilsalicílico y clopidogrel

Existe una gran variabilidad en la respuesta al tratamiento antiagregante por parte de los pacientes^{7,9}; esta resistencia puede ser detectada con tests bioquímicos o a nivel clínico debido a la aparición de nuevos eventos vasculares o recurrencias. A pesar de ser conceptos similares, existen diferencias entre ellos. Hablamos de resistencia a los antiagregantes cuando, tras realizar tests bioquímicos funcionales, se comprueba que la agregación plaquetaria no ha sido inhibida por el tratamiento antiagregante. La actividad normal de las plaquetas medida con estos tests funcionales es lo que comúnmente se define como resistencia. Por su parte, se define resistencia clínica o fallo del tratamiento como la ocurrencia de un evento cardiovascular a pesar de una correcta administración y una correcta adherencia al fármaco. No existe una clara asociación entre la resistencia medida por test bioquímico y la aparición de nuevos eventos vasculares o resistencia clínica.

Los test funcionales para el estudio de la resistencia a AAS y clopidogrel se basan en estudios, principalmente cinéticos, de agregación plaquetaria. Existen diversas técnicas agregométricas para determinar la agregación plaquetaria: agregometría óptica, agregometría de impedancia, producción de tromboxano A₂, sistema de análisis de función plaquetar (PFA-100), Uletegra RPPA-ASA, sistema de mapeo de plaquetas por tromboelastografía, vasodilatación estimulada por la fosforilación de fosfoproteína o estudio de cambios dependientes de la activación sobre la superficie de las plaquetas⁹. Desafortunadamente, los resultados obtenidos con estas técnicas no se correlacionan entre ellos,

tanto en pacientes tratados con AAS como con clopidogrel⁹, no existiendo hasta la fecha un consenso sobre cuál es el método bioquímico adecuado para medir la resistencia a antiagregantes.

Dado que después de un ictus aproximadamente un 60% de los pacientes reciben terapia con antiagregantes^{3,10}, es de gran importancia reconocer qué elementos son los causantes de resistencia para actuar en los pacientes resistentes, variando la dosis o realizando un cambio de tratamiento. Por ello, en los últimos años, se han iniciado estudios genéticos con el objetivo de averiguar si existe alguna relación entre el genotipo de los pacientes y la resistencia al tratamiento con antiagregantes.

La clasificación de pacientes entre metabolizadores rápidos o lentos

Tal y como se ha comentado anteriormente, el clopidogrel requiere ser transformado en un metabolito activo mediante las enzimas del CYP, para conseguir el efecto antiplaquetario. Los genes que codifican las enzimas del CYP son polimórficas, con varios alelos que confieren una función alterada¹¹. En función del genotipo CYP2C19, los individuos pueden ser clasificados según su fenotipo, dando lugar a metabolizadores extensivos (ME), intermedios (MI) o pobres (MP) y en el caso del alelo CYP2C19*17 en metabolizadores ultrarrápidos (MU). Ser MU para clopidogrel provoca un incremento en la inhibición plaquetaria y, por tanto, una disminución de la agregación plaquetaria residual (el alelo CYP2C19*17 puede estar asociado a un aumento del riesgo

Tabla 1 Resultados clínicos indicados según genotipo de CYP2C19

Dosis estándar		Terapia alternativa	
MU (*1/*17) (*17/*17)	ME (*1/*1)	MI (*1/*2) (*1/*3)	MP (*2/*2) (*2/*3)
Se transforma más clopidogrel de lo esperado en metabolito activo	Se transforma la cantidad esperada de clopidogrel a metabolito activo	Parte del clopidogrel, pero no el suficiente es transformado a metabolito activo	Muy poco o nada de clopidogrel es transformado en metabolito activo

El gen CYP2C19 es altamente polimórfico, los polimorfismos funcionales más comunes son *2, *3, * y 17, siendo CYP2C19*1 la variante normal. El resultado de la actividad enzimática, según el genotipo, es muy variable, influyendo en la capacidad de un individuo para activar el clopidogrel.

ME: metabolizadores extensivos; MI: metabolizadores intensivos; MP: metabolizadores pobres; MU: metabolizadores ultra-rápidos.

de sangrado). Los ME son aquellos con una inhibición plaquetaria normal y una agregación plaquetaria residual también normal. Para los MI existe una inhibición plaquetaria reducida, un aumento de la agregación plaquetaria residual y posiblemente, un aumento del riesgo de eventos cardiovasculares adversos. Los MP se caracterizan por una inhibición plaquetaria significativamente reducida y, por tanto, posiblemente se deberían asociar con un aumento del riesgo de eventos cardiovasculares adversos¹² (tabla 1).

Para la AAS, al tratarse de un fármaco ya activo, la clasificación de los diferentes tipos de metabolizadores es diferente de la que se utiliza para el clopidogrel. En este caso, los MU que tienen una actividad enzimática metabolizadora superior a lo normal, presentan unos niveles plasmáticos de AAS inferiores a lo habitual y, por tanto, la acción de la AAS inhibiendo la agregación plaquetaria es deficiente. Este tipo de pacientes se clasificarían como sujetos con resistencia al tratamiento antiagregante. En los MI y MP la actividad enzimática metabolizadora es inferior a lo esperado, haciendo que el fármaco se acumule en la sangre pudiendo generar toxicidad. Por tanto, solo los ME reciben las dosis adecuadas de medicamento (fig. 2).

Estudios genéticos mediante la estrategia de genes candidato en relación con la resistencia a antiagregantes

La farmacogenética es el área de la genética que analiza las variaciones genéticas que pueden modificar la respuesta a un tratamiento farmacológico.

En el área de farmacogenética mediante la aproximación de genes-candidato, se han encontrado polimorfismos relacionados con la resistencia a AAS y clopidogrel. La estrategia de genes candidato se basa en la selección de genes y polimorfismos que, debido a su función, se postula que pueden estar asociados a la patología de estudio. Los polimorfismos son variantes alélicas de una misma población, cada una de las cuales se presenta en más del 1% de la población y que pueden asociarse a características fenotípicas diferentes, como por ejemplo una diferente respuesta a fármacos. La estrategia de estudiar genes candidato es una estrategia sesgada porque se analizan solo un grupo reducido de polimorfismos de unos genes seleccionados; no obstante, ha resultado ser útil para algunas enfermedades y para algunos estudios de farmacogenética. En relación con la resistencia a AAS, diversos estudios han identificado polimorfismos

de un solo nucleótido (SNPs) en los genes *COX-1*, *COX-2*, *GPIa*, *GPIbα*, *GPIIIa*, *GPIV*, *FXIII*, *P2Y1*, *P2Y12*¹³, asociados a la resistencia a AAS. No obstante, ninguno de estos estudios se realizó con tamaños muestrales suficientes o con repeticiones en cohortes independientes para demostrar realmente la asociación de estos genes con la resistencia a AAS.

En el caso de clopidogrel, los primeros estudios que se realizaron mediante la estrategia de gen-candidato encontraron polimorfismos en los genes del CYP, principalmente en la subclase 2C19 (*CYP2C19*) pero también en *CYP2C9*, *CYP2B6*, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *CYP1A2* asociados a la resistencia

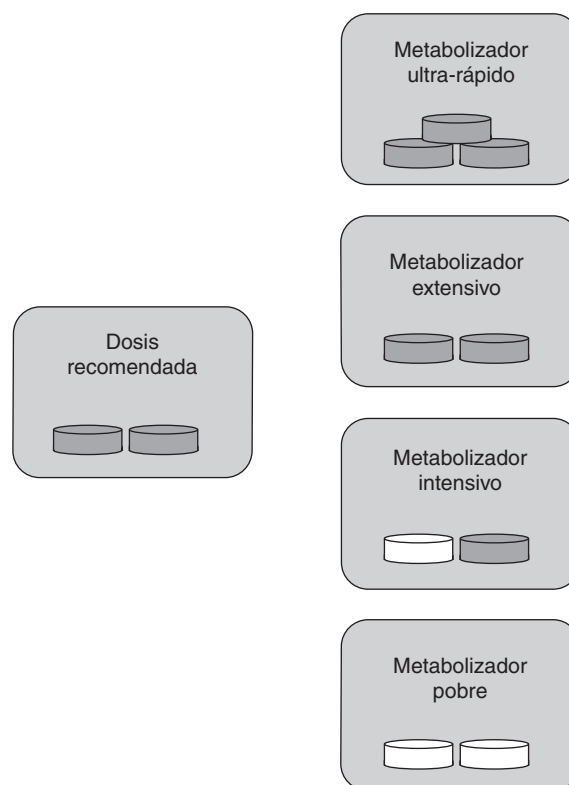


Figura 2 Dosis específica de fármaco según tipo de metabolizador para AAS: los metabolizadores ultrarrápidos necesitan más dosis de la habitual (son los sujetos resistentes), los metabolizadores extensivos necesitan la dosis estándar, para los metabolizadores intensivos y pobres es recomendable disminuir la cantidad de fármaco o cambiarlo. Píldora gris: fármaco administrado; píldora blanca: fármaco no administrado.

a clopidogrel. Otros genes con SNPs que se han relacionado con la resistencia a clopidogrel son el *P2RY12*, *ABCB1* o *PON1*^{11,14}, aunque estos últimos no han sido validados posteriormente.

Genome Wide Association y estudios de resistencia a antiagregantes

Una de las herramientas en relación a los estudios genéticos más empleada hoy en día son los Genome Wide Association Studies (GWAS). Los GWAS son habitualmente estudios caso-control a gran escala en los que se analiza un número elevado de polimorfismos, generalmente SNPs (10.000 a 2.000.000 polimorfismos). Con ello se pretende averiguar qué SNPs están asociados a un fenotipo concreto. Estos estudios permiten una aproximación libre de hipótesis previas y no sesgada para el estudio de las enfermedades complejas¹⁵.

Gracias a los GWAS se han encontrado genes asociados a diferentes enfermedades complejas que presentaban un componente genético que no se había descubierto hasta ese momento. En el caso del ictus, se han encontrado 2 loci (gen *PITX2* y gen *ZFX3*) asociados a ictus isquémico de tipo cardioembólico. También se han encontrado SNPs en los genes *CDK2MA* y *CDK2MB* del cromosoma 9 (locus 9p21)¹⁶ y el gen *HDAC9* del cromosoma 7 (locus 7p21.1)¹⁷ relacionados con ictus aterotrombótico.

En relación con la resistencia a clopidogrel, se ha realizado un único GWAS en el cual¹⁸ se administró clopidogrel durante 7 días a 429 personas sanas de origen amish. La respuesta al tratamiento fue medida por agregometría plaquetaria ex vivo. Se observó que la respuesta plaquetaria a clopidogrel tenía un alto componente hereditario ($h^2 = 0,73$; $p < 0,001$) y se identificaron 13 SNPs en el cromosoma 10 (locus 10q42) que conformaban el cluster *CYP2C18*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2C8*, asociados a la disminución de la respuesta a clopidogrel. El polimorfismo rs12777823 fue el que presentó un resultado estadísticamente más significativo ($p = 1,5 \times 10^{-3}$) en relación con la actividad plaquetaria. El SNP rs12777823 estaba en desequilibrio de ligamiento con la variante *CYP2C19**2 ($r^2 = 0,87$), uno de los polimorfismos que previamente ya se había encontrado asociado a la resistencia a clopidogrel mediante los estudios con genocandidato¹⁹ (tabla 2). En el estudio de Shuldiner et al.¹⁹, la replicación del GWAS se realizó en una nueva cohorte de pacientes. En esta replicación se analizó la variante *CYP2C19**C del CYP en desequilibrio de ligamiento con rs12777823, en 227 pacientes sometidos a una intervención coronaria. Los pacientes con la variante de riesgo *CYP2C19**C presentaron un mayor número de eventos vasculares durante el primer año después de la intervención coronaria.

Este y otros estudios han provocado que la American Food and Drugs Administration haya recomendado recientemente genotipificar el polimorfismo *CYP2C19**17 antes de prescribir clopidogrel²⁰ (tabla 2). Esta recomendación ha generado bastante controversia, puesto que la American Heart Association y el American College of Cardiologist defienden que no hay suficiente información para justificar que se hagan ese tipo de estudios de forma rutinaria²¹. En la última actualización sobre este tema, realizada por el Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC), en mayo del 2013²², proponen genotipificar el *CYP2C19* antes

de iniciar el tratamiento antiplaquetario. Esta actuación se recomienda, sobre todo, para pacientes con síndrome coronario agudo sometidos a una intervención coronaria percutánea. Esta recomendación es debida a que el mayor número de acontecimientos recurrentes y potencialmente previsibles se producen al principio del tratamiento, por tanto, mediante la genotipificación de *CYP2C19* se adaptaría el tratamiento a las características del paciente evitando nuevas recurrencias.

Respecto a la resistencia a AAS, se ha realizado un único GWAS en 2 cohortes: una formada por 2.753 sujetos pertenecientes al Framingham Heart Study y otra por 1.238 sujetos del Genetic Study of Atherosclerosis Risk tratados con AAS. En este estudio se midió por test bioquímico la resistencia a AAS y se encontraron 7 loci con polimorfismos asociados a la agregación plaquetaria; los resultados con $p < 0,05$ se replicaron en una cohorte de 840 pacientes del Genetic Study of Atherosclerosis Risk. Entre los genes más interesantes, se encontró *PEAR1* (rs12566888, $p = 3,4 \times 10^{-12}$) confirmando resultados previos respecto la asociación de este gen con la resistencia a AAS²³ (tabla 2).

PEAR1, o receptor endotelial de la agregación plaquetaria 1, codifica una proteína transmembrana en plaquetas, que es activada al ponerse en contacto con otras plaquetas. En un estudio previo de Herrera-Galeano et al.²⁴ en el que se genotipificaron 10 SNPs del gen *PEAR1* en 1.486 individuos sanos, se observó que el polimorfismo rs2768759 se asociaba a una mayor agregación plaquetaria después del tratamiento con AAS (tabla 2).

Más recientemente, Lewis et al.²⁵ realizaron un GWAS en el que también se medía la agregación plaquetaria, en 565 pacientes procedentes del estudio Pharmacogenomics of Anti-Platelet Intervention (PAPI) antes y después del tratamiento con AAS. Los resultados revelaron una fuerte asociación entre SNPs del cromosoma 1q23.1 y la respuesta a AAS. Los hallazgos más significativos fueron genotipificados en 2 nuevas cohortes, una formada por 227 pacientes con intervención coronaria y otra con 1.000 pacientes procedentes del International Verapamil SR/Trandolapril Study (INVEST) subestudio genético (INVEST-GENES). Tras estas replicaciones en cohortes independientes, se observó que el SNP rs12041331 del gen *PEAR1* mostraba la mayor asociación ($p = 7,66 \times 10^{-9}$) con la respuesta a la terapia antiagregante. Estos resultados fueron confirmados por el estudio de Kim et al.²⁶, en el que se realizó la secuenciación exónica de *PEAR1* en 104 sujetos con hipo o hiperagregación plaquetaria y se observó que el mismo polimorfismo (rs12041331) tenía la asociación más significativa ($p = 4,02 \times 10^{-4}$) respecto a la respuesta a la agregación plaquetaria.

La problemática entre la resistencia medida por test bioquímico y la recurrencia vascular o resistencia clínica

A pesar de los esfuerzos dedicados a encontrar los factores genéticos causantes de la resistencia a los fármacos antiagregantes y la recurrencia vascular, no se han obtenido datos del todo esclarecedores. Por el momento, no se ha visto una asociación clara entre la actividad plaquetaria medida por las diferentes técnicas comentadas y la recurrencia vascular²⁷⁻²⁹ o resistencia clínica. Consecuentemente, los

Tabla 2 Principales polimorfismos identificados con relación a la agregación plaquetaria

Fármaco	Gen	SNP	Efecto	Referencia
AAS	PEAR1	rs12041331	Aumento de la agregación plaquetaria	24
		rs12566888	Aumento de la agregación plaquetaria	21
		rs2644604	Aumento de la agregación plaquetaria	23
		rs2768759	Aumento de la agregación plaquetaria	23
Clopidogrel	CYP2C19*2	rs4244285	Pérdida de función, reducción del metabolito activo	11,19
		rs12777823	Pérdida de función, reducción del metabolito activo	19
	CYP2C19*3	rs4986893	Pérdida de función, reducción del metabolito activo	11,12
	CYP2C19*17	rs12248560	Aumento de función, potenciador de la inhibición de la agregación plaquetaria	11,12

polimorfismos que se han visto asociados con la actividad plaquetaria tampoco presentan una asociación clara con la recurrencia vascular^{27,29}. Por ejemplo, en el subestudio genético del estudio Clopidogrel for High Atherothrombosis (CHARISMA), en el que se genotipificaron 4.819 pacientes (que habían presentado un ictus o un infarto de miocardio) estables tratados con clopidogrel y se analizó el efecto de los polimorfismos rs11188078 y rs12248560 del alelo CYP2C19*17, finalmente se observó que no afectaban a nuevos eventos isquémicos o de sangrado³⁰.

En un reciente metaanálisis de 32 estudios que incluía el análisis de 42.016 pacientes tratados con clopidogrel con 3.545 eventos cardiovasculares, siendo uno de los estudios más importantes en el campo de la farmacogenética de la resistencia a clopidogrel, se observó que los alelos de CYP2C19 se asociaron a recurrencia vascular; no obstante, cuando los análisis se restringían a estudios con al menos 200 sujetos con recurrencia vascular la asociación de los polimorfismos de CYP2C19 no era significativa, concluyendo que no existía una clara evidencia entre la asociación de CYP2C19 con nuevos eventos cardiovasculares³⁰.

Existen varias explicaciones para justificar esta falta de asociación que debería encontrarse entre actividad plaquetaria (resistencia) y recurrencia vascular y entre polimorfismos asociados a actividad plaquetaria y recurrencia vascular.

Por un lado, están los problemas de seguimiento a los pacientes incluidos en los estudios. Uno de los problemas más habituales es la falta de adherencia al tratamiento por parte del paciente, pero también se han relatado casos en los que existe un cambio en la medicación antiagregante durante el seguimiento, creando en ambos casos sesgos en el estudio y, por tanto, reduciendo el poder estadístico del estudio. Estos sesgos pueden causar que los SNPs asociados a la resistencia a los fármacos antiagregantes no se asocien a la aparición de nuevos eventos vasculares.

A nivel genético, existen diversas posibilidades que expliquen esta falta de asociación entre los polimorfismos asociados a la resistencia a antiagregantes y su falta de asociación a la recurrencia vascular. Por ejemplo, que aunque la actividad plaquetaria influya en la recurrencia vascular, esta sea una asociación de un grado mucho menor a lo esperado, por tanto, los polimorfismos asociados a la actividad plaquetaria no se asociarán significativamente a la recurrencia vascular.

Para resolver estas dudas se necesitan, primero, estudios con mayores tamaños poblacionales, con un mejor diseño y con un mejor seguimiento y, segundo, estudios realizados directamente en pacientes con resistencia clínica o fallo en el tratamiento, es decir, realizar estudios directamente en pacientes que a pesar del correcto tratamiento antiagregante han presentado una recurrencia vascular.

Por otro lado, nos podemos encontrar con que otros factores genéticos, no analizados hasta el momento, estén relacionados con la resistencia medida mediante la actividad plaquetaria y con la aparición de recurrencia vascular. Puede ser el caso de variaciones raras, factores epigenéticos o variaciones en el número de copias que por problemas como un reducido tamaño muestral o por no utilizar las herramientas adecuadas no hayan sido detectadas.

Futuro

Los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados hasta el momento no han aportado toda la información esperada para determinar el componente genético asociado a la resistencia a antiagregantes, así pues son necesarios nuevos estudios y nuevas aproximaciones en este campo. En los próximos años probablemente tendremos estudios epigenéticos y de secuenciación de nueva generación en el campo de la farmacogenética de la resistencia a antiagregantes³¹.

La secuenciación de nueva generación supone una gran mejora, mucho más rápida y económica, respecto a la secuenciación tradicional por Sanger³⁰. Estas técnicas se están empezando a utilizar para confirmar loci encontrados mediante GWAS y para identificar variaciones estructurales en el genoma. También los análisis epigenéticos permitirán estudiar los mecanismos de expresión genética independientes de la secuencia de ADN en pacientes resistentes a los fármacos antiagregantes³².

El desarrollo de herramientas bioinformáticas para analizar las enormes cantidades de información generada por estas técnicas también será crucial para un rápido avance en este campo³². Otro punto crucial para el estudio de la farmacogenética en enfermedades complejas pasa por la creación de consorcios con el fin disponer de mayores tamaños muestrales y conseguir fenotipos mejor definidos. Con ello no solo se aumentará el poder estadístico

de los estudios, también se podrán detectar nuevos SNPs no encontrados hasta la fecha. Algunos de los consorcios que están trabajando en este campo son: International Clopidogrel Pharmacogenomics Consortium con el objetivo de incrementar el número de sujetos y realizar estudios genéticos en sujetos con un mejor seguimiento clínico, el CPIC (<http://www.pharmgkb.org/page/cpic>), el International Stroke Genetics Consortium (<http://www.strokegenetics.org/>) y el Consorcio Español de Genética del Ictus (GeneStroke) (<http://www.genestroke.com/>) son otros ejemplos de grandes consorcios que estudian la resistencia al tratamiento antiagregante. En el marco de la cantidad de datos que se genera con estas nuevas técnicas, también toman gran importancia los repositorios online y diferentes bases de datos. Algunas de las más importantes en este área son «pharmGKB» (<http://www.pharmgkb.org/>), donde se puede encontrar información sobre el impacto de las variaciones genéticas en respuesta a los fármacos, dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), un archivo público sobre las variaciones genéticas en diferentes especies, o dbGaP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap>), base de datos con información sobre fenotipos y genotipos. Para los estudios GWAS es de gran utilidad Genetic Association Database (<http://geneticassociationdb.nih.gov/>), donde se pueden encontrar datos de GWAS publicados en diferentes estudios.

Conclusiones

Aumentar nuestro conocimiento sobre el funcionamiento de los fármacos en la prevención de nuevos eventos vasculares promete tener un impacto global en la promoción de la salud. En el campo de la genética será necesario la utilización de las nuevas técnicas genómicas puestas a nuestro alcance y la organización de estudios dentro de consorcios internacionales para mejorar el fenotipo de los pacientes y el tamaño muestral de los estudios con el objetivo de generar grandes proyectos en este campo que puedan aclarar las dudas existentes hasta el momento. Por el momento, los estudios realizados no han demostrado una asociación definitiva entre los polimorfismos asociados a la resistencia clínica y la recurrencia vascular. Ensayos clínicos prospectivos serían necesarios para demostrar claramente esta asociación y utilizar el genotipificado de estos genes como una herramienta estándar en la práctica clínica. No obstante, en el caso de la resistencia a clopidogrel, en los estudios realizados, aunque no son definitivos, sí que parece existir una relación entre determinados polimorfismos y la actividad plaquetaria. Por tanto, los pacientes susceptibles a tener una resistencia al tratamiento debido a la presencia de polimorfismos de riesgo en la familia del CYP450 podrían ser tratados con otro antiagregante concretamente con un tratamiento con AAS y clopidogrel en el caso del ictus.

Financiación

Este estudio fue financiado por una subvención del Instituto Carlos III, del gobierno español, programa Miguel Servet (CP12/03298). IF-C está financiado con el apoyo del

programa Miguel Servet (CP12/03298) del Ministerio de Sanidad Español (Instituto de Salud Carlos III).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

El laboratorio de Genética y Farmacogenómica del Ictus forma parte del Consorcio Internacional de Genética del Ictus y coordina el Consorcio Español de Genética del Ictus (www.genestroke.com).

Bibliografía

1. Arias-Rivas S, Vivancos-Mora J, Catillo J. Epidemiología de los subtipos de ictus en pacientes hospitalizados atendidos por neurólogos: resultados del registro EPICES (I). *Rev Neurol*. 2012;54:385–93.
2. Clark TG, Murphy MF, Rothwell PM. Long term risks of stroke, myocardial infarction, and vascular death in «low risk» patients with a non-recent transient ischaemic attack. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74:577–80.
3. Markus HS. Stroke genetics: Prospects for personalized medicine. *BCM Medicine*. 2012;10:113.
4. Born G, Patrono C. Antiplatelet drugs. *Br J Pharmacol*. 2006;147(Suppl 1):S241–51.
5. Greer DM. Aspirin and antiplatelet agent resistance: Implications for prevention of secondary stroke. *CNS Drugs*. 2010;24:1027–40.
6. González Hernández A, Fabre Pi Ó, López Fernández JC. Tratamiento combinado con antitrombóticos en la prevención secundaria del ictus isquémico. *Médicas UIS*. 2009;22:235–44.
7. Zhou K, Pearson ER. Insights from Genome-Wide Association Studies of drug response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:299–310.
8. Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: A comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66:222–32.
9. Feher G, Feher A, Pusch G, Koltai K, Tibold A, Gasztonyi B, et al. Clinical importance of aspirin and clopidogrel resistance. *World J Cardiol*. 2010;2:171–86.
10. Reny JL, Berdagué P, Poncet A, Barazer I, Nolli S, Fabbro-Peray P, et al. Antiplatelet drug response status does not predict recurrent ischemic events in stable cardiovascular patients: Results of the Antiplatelet Drug Resistances and Ischemic Events study. *Circulation*. 2012;125:3201–10.
11. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphism and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. 2009;360:354–62.
12. Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, Stein CM, Hulot JS, Johnson JA, et al., Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;90:328–32.
13. Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: A comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66:222–32.
14. Yin T, Miyata T. Pharmacogenetics of clopidogrel: Evidence and perspectives. *Thromb Res*. 2011;128:307–16.

15. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* 2005;6:96–108.
16. Markus HS. Stroke genetics. *Hum Mol Genet.* 2011;20(R2):R124–31.
17. Internacional Stroke Genetics Consortium (ISGC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC) Bellenquex C, Bevan S, Gschwendther A, Spencer CC, Burgess AL, Pirinen M, et al. Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke. *Nat Genet.* 2012;44:328–33.
18. Traylor M, Farral M, Holliday EG, Sudlow C, Hopewell JC, Cheng YC, et al. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): A meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2012;11:951–62.
19. Shuldiner AS, 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.
20. Nissen SE. Pharmacogenomics and clopidogrel: Irrational exuberance. *JAMA.* 2011;306:2727–8.
21. Holes Jr DR, Dehmer GJ, Kaul S, Leifer D, O'Gara PT, Stein CM. ACCF/AHA clopidogrel clinical alert: Approaches to the FDA «boxed warning»: A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on clinical expert consensus documents and the American Heart Association endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:321–41.
22. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94:317–23.
23. Johnson AD, Yanek LR, Chen MH, Faraday N, Larson MG, Tofler G, et al. Genome-wide meta-analysis identifies seven loci associated with platelet aggregation in response to agonists. *Nat Genet.* 2010;42:608–13.
24. Herrera-Galeano JE, Becker DM, Wilson AF, Yanek LR, Bray P, Vaidya D, et al. A novel variant in the platelet endothelial aggregation receptor-1 is associated with increased platelet aggregability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1484–90.
25. Lewis JP, Ryan K, O'Connell JR, Horenstein RB, Damcott CM, Gibson Q, et al. Genetic variation in PEAR1 is associated with platelet aggregation and cardiovascular outcomes. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6:184–92.
26. Kim Y, Suktitipat B, Yanek LR, Faraday N, Wilson AF, Becker DM, et al. Targeted deep resequencing identifies coding variants in the PEAR1 gene that play a role in platelet aggregation. *PLoS One.* 2013;8:e64179.
27. Ferreiro JL, Sibbing D, Angiolillo DJ. Platelet function testing and risk of bleeding complications. *Thromb Haemost.* 2010;103:1128–35.
28. Reny JL, Berdagué P, Poncet A, Barazer I, Nolli S, Fabbro-Peray P, et al. Antiplatelet drug response status does not predict recurrent ischemic events in stable cardiovascular patients: Results of the Antiplatelet Drug Resistances and Ischemic Events study. *Circulation.* 2012;125:3201–10.
29. Sibbling D, Bernlochner I, Kastrati A, Paré G, Eikelboom JW. Current evidence for genetic testing in clopidogrel-treated patients undergoing coronary stenting. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011;4:505–13.
30. Bhatt DL, Paré G, Eikelboom JW, Simonsen KL, Emison ES, Fox KA, et al. The relationship between CYP2C19 polymorphisms and ischemic and bleeding outcomes in stable outpatients: the CHARISMA genetics study. *Eur Heart J.* 2012;33:2143–50.
31. Holmes MV, Perel P, Shah T, Hingorani AD, Casas JP. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2011;306:2704–14.
32. Schenabel RB, Baccarelli A, Lin H, Ellinor PT, Benjamin EJ. Next steps in cardiovascular disease genomic research —sequencing, epigenetics, and transcriptomics. *Clin Chem.* 2012;58:113–26.

