



---

# **Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Biología Celular,  
Histología y Farmacología

## **Polimorfismos genéticos de *COX-1* y *eNOS* y hemorragias gastrointestinales; interacciones con AINE. Un estudio de casos y controles**

**María Inés Salado Valdivieso**

**Valladolid, 2013**





---

**Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Biología Celular,  
Histología y Farmacología

TESIS DOCTORAL

**Polimorfismos genéticos de *COX-1* y *eNOS* y  
hemorragias gastrointestinales; interacciones  
con AINE. Un estudio de casos y controles**

Presentada por M<sup>a</sup> Inés Salado Valdivieso para optar al grado  
de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:  
Alfonso Carvajal García-Pando



## **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

*(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)*

**D. ALFONSO CARVAJAL GARCÍA-PANDO**, con D.N.I. nº **6194373-J**, profesor del departamento de **BIOLOGÍA CELULAR, HISTOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**, Centro **FACULTAD DE MEDICINA**, como Director de la Tesis Doctoral titulada **POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE COX-1 Y ENOS Y HEMORRAGIAS GASTROINTESTINALES; INTERACCIONES CON AINE. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES**; presentada por

**Dña. MARIA INÉS SALADO VALDIVIESO**, alumna del programa de doctorado de **Farmacología**, impartido por el departamento de **Biología Celular, Histología y Farmacología**, autoriza la presentación de la misma, considerando que **cumple con los requisitos necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral en la Universidad de Valladolid.**

Valladolid, 20 de diciembre de 2013

El Director de la Tesis,

Fdo.: Alfonso Carvajal García-Pando

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO**



## **Agradecimientos**

*Quiero dar las gracias al Dr. Alfonso Carvajal, mi director de tesis, por su paciencia y dedicación en este trabajo; por introducirme en la farmacoepidemiología e invitarme a formar parte de su equipo investigador durante los últimos nueve años.*

*A mis queridas compañeras de departamento Kika León, María Sáinz, Verónica Velasco, Cristina Campo y Sara Ortega por estar conmigo en los momentos de desánimo; por su amistad y los buenos ratos que hemos pasado en la tercera planta de la Facultad de Medicina. A Luis Martín, por sus consejos y valiosas opiniones.*

*A los monitores, investigadores y pacientes que formaron parte del proyecto, especialmente al Dr. Luis Orbañanos y el Dr. Borja Ruiz por facilitar mi tarea como doctoranda y por darme ánimos para seguir sus pasos. A Ángel Salgado de quien guardo un grato recuerdo de los momentos de trabajo en Santiago de Compostela.*

*Al Dr. Eladio Velasco por su labor en la parte genética; por dedicarme su tiempo y compartir conmigo sus investigaciones y porque siempre he recibido una respuesta pronta y amable a mis múltiples dudas. Y a todo el personal del laboratorio de genética del cáncer del IBGM por su inestimable ayuda en la parte técnica, por prestarme su espacio y su tiempo.*

*A Dani, que siempre me ha apoyado en todos mis proyectos, por su paciencia y comprensión. A mis hermanos y amigos por el tiempo que la realización de este trabajo me ha quitado de estar con ellos.*

*Y sobre todo, quiero agradecer a mis padres el esfuerzo y la preocupación que han puesto siempre en mi formación y en especial gracias a mi madre que siempre ha sido un modelo a seguir de trabajo, dedicación y sacrificio y sin cuya ayuda desinteresada en el cuidado de mi hija no habría sido posible acabar este trabajo.*



*A mi hija Elvira y a Mencía,  
cuya llegada esperamos con ilusión.*

*"Si no fuese por la gran variabilidad entre los individuos,  
la medicina podría ser una ciencia y no un arte"*

William Osler



Índice



Prólogo.....	1
I. Introducción.....	5
Antiinflamatorios no esteroideos.....	8
Hemorragia gastrointestinal.....	19
Factores ambientales o exógenos y riesgo de hemorragia.....	21
Factores genéticos o endógenos y riesgo de hemorragia.....	25
II. Objetivos.....	37
III. Material y método.....	41
IV. Resultados.....	61
V. Discusión.....	75
VI. Conclusiones.....	85
Bibliografía.....	89
Anexos.....	103
Anexo 1. Cuestionarios.....	103
Anexo 2. Hoja de anamnesis farmacológica.....	123
Anexo 3. Guía de codificación.....	127
Anexo 4. Modelos de Pront-Cards.....	131
Anexo 5. Consentimientos informados.....	137
Anexo 6. Modelo de Base de Datos.....	149
Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN a partir de linfocitos.....	153
Anexo 8. Condiciones de PCR para las sondas Taqman y termociclador de PCR-rt empleados en el estudio de los polimorfismos de COX-1.....	157
Anexo 9 . Aprobaciones de los Comités Éticos.....	161
Anexo 10. Otros resultados de interés.....	171
Anexo 11. Publicaciones relacionadas con el estudio.....	185
Glosario de términos.....	201



## Prólogo



El estudio que se presenta se ha llevado a cabo con parte de la vasta información recogida por el proyecto Emphogen. El proyecto Emphogen es una colaboración de investigación multicéntrica en el que participan 5 universidades, la Universidad de Santiago de Compostela, la Universidad del País Vasco, la Universidad Autónoma de Barcelona, la Universidad de Verona y la Universidad de Valladolid. El proyecto está orientado a conocer los factores de riesgo que se asocian con la hemorragia gastrointestinal; a este respecto, la mayor parte de los estudios hasta la fecha se han centrado en factores de riesgo ambientales, tales como los medicamentos, el *Helicobacter Pylori* o los antecedentes personales. En este proyecto, sin renunciar a la exploración de todos esos factores, se han abordado también los factores genéticos; estos se han analizado como factores únicos o como factores de interacción con los medicamentos. Existen razones obvias para que las cosas durante estos años hayan ocurrido según esta secuencia, estas razones no son otras que la disponibilidad actual de técnicas que permiten estudiar estos factores de índole genética, bien como entidades aisladas —genes candidatos—, o bien en una exploración masiva de todo el genoma —genoma completo, GWAS—.

Nuestro estudio se centra en dos genes que codifican enzimas ubicuas en el organismo pero que, por lo que nos interesa, se relacionan con la protección de la mucosa gástrica. Estas enzimas, ciclooxigenasa 1 (COX-1) y óxido nítrico sintasa constitutiva (eNOS), catalizan la síntesis de prostaglandinas y de óxido nítrico, respectivamente. Las variantes genéticas de los genes

reguladores de estas enzimas se han asociado a distintas alteraciones funcionales.

El trabajo que se presenta para optar al grado de doctor, está estructurado de manera convencional en una Introducción, Método, Resultados, Discusión y Bibliografía; a esto, hemos añadido algo menos convencional, unos Anexos. Hemos creído conveniente añadir esta información para que los posibles lectores dispongan de una mejor perspectiva y, además, que nos sirva como material de trabajo en futuras investigaciones.

## I. Introducción



La hemorragia gastrointestinal alta es un cuadro patológico grave que está producido por medicamentos en un porcentaje elevado de los casos. Ciertos fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los antiagregantes plaquetarios o los anticoagulantes orales, pueden dar lugar a una hemorragia que exija la hospitalización del paciente y, en ocasiones, provoque la muerte. Además de los fármacos, se han identificado otros factores que se asocian con la hemorragia gastrointestinal; entre ellos estaría la infección por *Helicobacter pylori* o el consumo de determinadas sustancias como el alcohol, el tabaco o la cafeína.

Se admite para la hemorragia gastrointestinal también una susceptibilidad genética que haría que ciertos individuos presentaran esta reacción con una mayor frecuencia al ser expuestos a determinados fármacos.

## Antiinflamatorios no esteroideos

Los AINE son un grupo muy heterogéneo de fármacos. Aunque comparten los mismos efectos farmacológicos y el mismo patrón de reacciones adversas, tienen distinta estructura química. El prototipo de este grupo es la aspirina. La síntesis del ácido acetil salicílico fue llevada a cabo por Felix Hoffman en 1893 y comercializada por Bayer en el año 1900. Desde ese momento, han sido muchos los AINE sintetizados y comercializados. En la tabla 1 se muestran algunos de los principales grupos de AINE y sus representantes más genuinos.

Tabla 1. Principales grupos de AINE y sus exponentes

Grupos farmacológicos	Fármacos prototipo
Salicilatos	Aspirina (ácido acetil salicílico)
Derivados enólicos	fenilbutazona, piroxicam, meloxicam
Derivados acéticos	indometacina, ketorolaco, aceclofenaco, diclofenaco, etodolaco, sulindaco, tolmetina
Derivados propiónicos	ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno
Derivados antranílicos	ac. mefenámico, ac. niflúmico
Coxibs	celecoxib, rofecoxib
Otros	nimesulida, nabumetona

Es este, el de los AINE uno de los grupos terapéuticos más prescritos en todo el mundo. En Estados Unidos se dispensaron alrededor de 121 millones de prescripciones de AINE en el año 2011 (Laine y cols., 2012; IMS

Institute for Healthcare Informatics, 2011). En España, esta cifra fue de 40 millones de prescripciones durante el año 2010, siendo el ibuprofeno el tercer principio activo más prescrito en ese año, solo superado por el omeprazol y del paracetamol (Ministerio Sanidad SPeI, 2011). Además, se estimó que el consumo de AINE en España durante el periodo 1990-2003 se había duplicado, y que el patrón de uso había cambiado considerablemente durante esa década, observándose un aumento en el uso de los AINE con mejor perfil gastrointestinal (De Abajo y cols., 2005). En una actualización posterior de estos datos (periodo 1992-2006), además de encontrar el mismo patrón de uso, se identificó un incremento considerable en el uso de ibuprofeno y análogos, como se observa en la figura 1 (García del Pozo y De Abajo, 2007). Asociado al consumo de estos fármacos, el número de muertes atribuibles al uso de AINE en España durante ese mismo periodo, fue de 15,3 muertes por cada 100.000 pacientes tratados con estos fármacos (Lanas y cols., 2005). Estos estudios recogen la información a través de las recetas facturadas al Sistema Nacional de Salud. Existe además un consumo de AINE, al margen de la prescripción médica, de difícil cuantificación -en cualquier caso, elevado-, por lo que las cifras mencionadas serían en realidad mucho mayores.

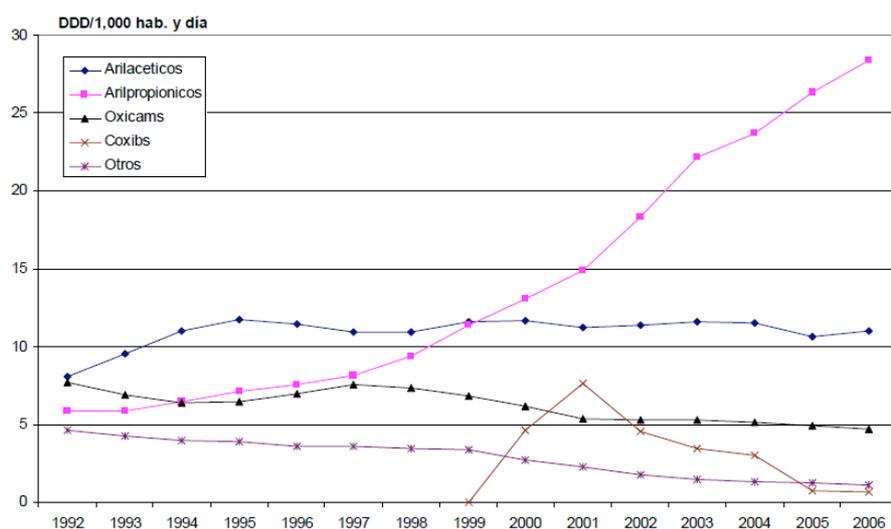


Figura 1. Evolución de la utilización de AINE en España. Datos del Sistema Nacional de Salud para el periodo 1992-2006 (García del Pozo y De Abajo, 2007)

### **Mecanismo de acción**

Los AINE producen sus efectos mediante la inhibición competitiva y reversible de la ciclooxigenasa (COX). Esta enzima cataliza la conversión del ácido araquidónico en los distintos eicosanoides. La aspirina, en particular, inhibe la enzima de manera irreversible; se une de forma covalente y acetila un resto de serina en el lugar activo de la enzima (Vane y Botting, 1998). El ácido araquidónico se forma a partir de los fosfolípidos de la membrana celular por acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y, a través de las ciclooxigenasas 1 y 2, dará lugar a la formación de prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX). A partir del ácido araquidónico se sintetizan también los leucotrienos (LT) siguiendo otra ruta en la que participan las lipooxigenasas; esto se representa en la figura 2 (Ulrich y cols., 2006).

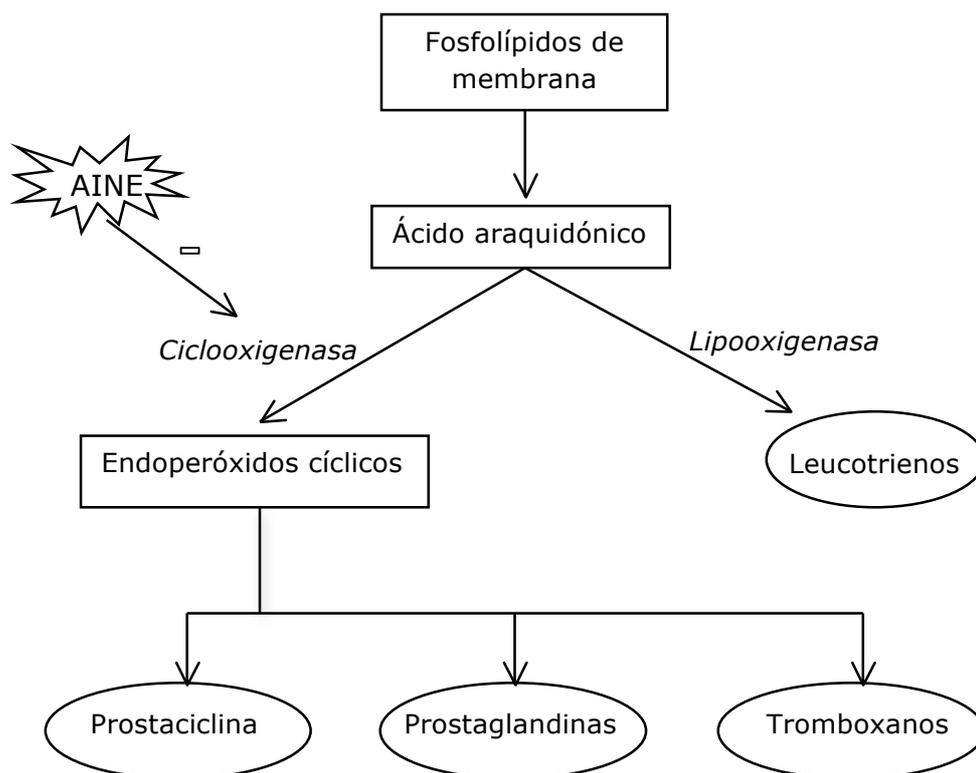


Figura 2. Esquema de la ruta biosintética de las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos y lugar de acción de los AINE

Los eicosanoides formados a partir del ácido araquidónico intervienen en múltiples funciones orgánicas y se sintetizan en casi todos los tipos celulares en respuesta a diferentes estímulos. En el tracto gastrointestinal, actúan como vasodilatadores en la mucosa gástrica e intestinal, incrementan la producción de bicarbonato y moco y ejercen así un efecto protector. El papel fundamental de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y de la prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), también llamada prostaciclina, es pues el de mantener la integridad del epitelio digestivo. Por el contrario, un aumento en la síntesis de tromboxanos y leucotrienos, en concreto del leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), se relaciona con algunos tipos de ulceración péptica y de enfermedad inflamatoria intestinal (Ferrer y Moreno, 2010).

Tanto los efectos beneficiosos –analgésicos y antiinflamatorios– de los AINE, como las reacciones adversas gastrointestinales que producen, derivan en gran medida de su efecto inhibitor de las ciclooxigenasas, impidiendo la formación de PG citoprotectoras que limitan la secreción de ácido y estimulan la secreción de moco. Existen, no obstante, otros mecanismos que producen toxicidad gastrointestinal no dependiente de la inhibición de la síntesis de PG; entre ellos se encontraría la inhibición de la formación de óxido nítrico, ácido sulfhídrico o poliamidas; o, la afectación de la función de los neutrófilos los cuales inducen la liberación de factores tisulares destructores. También se puede considerar, además del mecanismo de acción sistémico, otro local, directo, a través de la unión del AINE a la membrana plasmática de la célula epitelial (Musumba y cols., 2009; Zhou y Lichtenberger, 2010); esto produciría una lesión por un mecanismo dependiente del pH de la mucosa y por reducción del flujo sanguíneo local. Cabría añadir, que el óxido nítrico ha demostrado un papel protector de la mucosa gastrointestinal en diversos modelos animales, cualidad que se ha empleado en el desarrollo de los llamados AINE liberadores de óxido nítrico (Davies y Wallace, 1997).

Las COX, también llamadas prostaglandina endoperóxido sintasas (PTGS), son enzimas diméricas compuestas por alrededor de 600 aminoácidos de las que se conocen dos isoformas principales, la COX-1 y la COX-2; en adelante nos referiremos a estas enzimas como COX. Los genes a partir de los cuales

se sintetizan estas dos enzimas, están localizados en cromosomas diferentes. También se ha descrito una COX-3 con actividad enzimática pero en este caso es una isoforma que deriva de la COX-1 tras realizar un procesamiento o *splicing* alternativo (Davies y cols., 2004). La COX-1 se expresa en la mayoría de las células y tejidos de forma estable y continua, y es responsable de la síntesis de los eicosanoides implicados en la homeostasis de múltiples funciones fisiológicas, como por ejemplo el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, ya mencionado, la activación plaquetaria, la función renal o la diferenciación de macrófagos. El gen *COX-1* se encuentra localizado en el cromosoma 9, en la posición 9q32-q33.3. La enzima COX-2, por el contrario, aunque también está presente en algunos tejidos en pequeñas cantidades, incrementa su expresión de forma considerable cuando se produce un proceso inflamatorio. Además de intervenir en procesos inflamatorios, interviene también en el proceso de reproducción, en las funciones renales y neurológicas, y en la actividad antitrombótica de las células epiteliales. El gen *COX-2* contiene sitios de unión para muchos factores de transcripción, entre ellos las citoquinas inflamatorias, que no se encuentran en el gen *COX-1*. La enzima COX-1 es la única isoforma presente a la vez en la mucosa gástrica normal y en las plaquetas, de ahí que la inhibición producida por los AINE de la COX-1 plaquetaria, junto a la inhibición de la COX-1 gástrica, sean dos de los posibles mecanismos de producción de hemorragias gastrointestinales por AINE (Lipsky y cols., 2000).

La mayoría de los AINE, a concentraciones terapéuticas, inhibe de forma reversible y no selectiva las dos isoformas. Algunos como el diclofenaco, meloxicam, peroxicam o la nimesulida (retirada del mercado en España en 2002), demuestran cierta selectividad preferente por la COX-2. Otros como el celecoxib y el rofecoxib (retirado del mercado en España en 2004) parecen inhibir preferentemente la COX-2, que no se expresa en células de la mucosa gástrica. Como se ha señalado antes, la aspirina inhibe las dos isoformas de manera irreversible, mediante la acetilación de un resto de serina de la ciclooxigenasa.

### **Acciones farmacológicas**

Así pues, todos los AINE comparten los mismos efectos farmacológicos; se hace un comentario al final de este epígrafe sobre los AINE inhibidores selectivos de la COX-2 por tener un perfil distinto, al menos en el plano teórico. Los AINE presentan una actividad analgésica moderada. Son eficaces en cefaleas, dolores articulares, musculares y dentales, así como en dolores postoperatorios, postraumáticos, de tipo cólico e incluso en las primeras etapas de los dolores del cáncer, también son eficaces en la dismenorrea. Intervienen en cualquiera de las fases de la inflamación (vasodilatación, edema, dolor) y con independencia de la causa que la provoque (traumática, física, química o inmunológica). Reducen la temperatura corporal cuando está previamente aumentada por la acción de pirógenos, pero no producen hipotermia. No influyen en la temperatura cuando está aumentada como consecuencia del ejercicio o por la temperatura ambiente. La aspirina y otros salicilatos están contraindicados en niños menores de 16 años con fiebre, ya que podría dar lugar a la aparición del Síndrome de Reye, que afecta al hígado y al cerebro y aunque se trata de un síndrome de baja incidencia, tiene una elevada mortalidad (AEMED. Nota Informativa 2003/06, 2003). La fiebre es un síntoma muy frecuente en los pacientes con cáncer, se cree que pudiera estar ocasionada por un pirógeno producido por el tumor que actúa en el hipotálamo desregulando la temperatura corporal. En estos pacientes, la fiebre puede utilizarse como marcador tumoral y el tratamiento sería el de la neoplasia subyacente y AINE (Calvo y Apolinario, 2004).

Los AINE inhiben la COX-1 plaquetaria y esta inhibición es especialmente importante en el caso de la aspirina, al ser irreversible. La plaquetas, al carecer de núcleo no pueden generar más enzima y la inhibición permanece durante toda la vida de las plaquetas –de 8 a 10 días. Gracias a esta acción antiagregante plaquetaria que se produce a dosis bajas, la aspirina se emplea en Cardiología para la prevención de eventos cardiovasculares.

Los inhibidores selectivos de la COX-2, tales como celecoxib, parecoxib, lumiracoxib, rofecoxib (retirado en 2004 del mercado en España), o valdecoxib, (retirado en 2005 del mercado en España), al tener poca

afinidad por la enzima COX-1 no interfieren, en teoría, en la síntesis a nivel gastrointestinal de PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>. En cambio en las plaquetas, inhiben la síntesis de PGI<sub>2</sub>; pero la síntesis de TXA<sub>2</sub>, que depende de la COX-1, no se modifica, por lo que se produciría una alteración en el equilibrio de estos prostanoides lo que contribuiría a un incremento de los procesos ateroscleróticos y trombogénicos y con ello un aumento del riesgo de complicaciones cardiovasculares (Fosslien, 2005). Sin embargo, comparados con otros AINE, los inhibidores selectivos de la COX-2 parecen producir menos complicaciones gastrointestinales y producen alteraciones cardiovasculares similares (Moore y cols., 2007; Laharie y cols., 2010).

### **Metabolismo**

La principal vía de metabolismo de los AINE es la oxidación a través de los microsomas hepáticos del citocromo P-450, la conjugación con ácido glucurónico por las uridina-5'-difosfato(UDP)-glucuronosiltransferasas (UGT) y, en menor medida, la conjugación con ácido sulfúrico por las sulfotransferasas (Figura 3).

La isoenzima CYP2C9 del citocromo P-450 tiene como sustratos al 10-20% de los fármacos de uso más frecuente, entre ellos están, la mayoría de los AINE. Por ejemplo, celecoxib, ibuprofeno y piroxicam se metabolizan principalmente a través de la isoenzima CYP2C9; aceclofenaco e indometacina tienen metabolismo parcial (50-90%) a través de CYP2C8 y CYP2C9; diclofenaco, naproxeno, parecoxib y valdecoxib tienen metabolismo secundario (10-50%) a través de CYP2C8 y CYP2C9 (Martinez y cols., 2006; Agundez y cols., 2009).

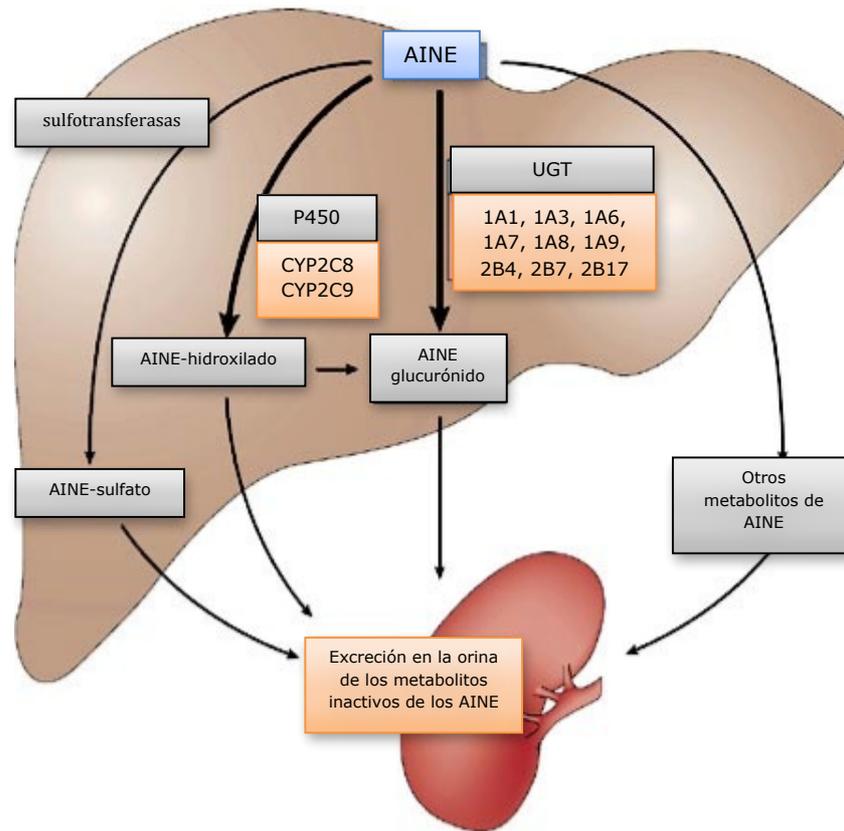


Figura 3. Esquema de las principales vías metabólicas de inactivación de los AINE (Ulrich y cols., 2006)

### **Reacciones adversas**

Las ciclooxygenasas se expresan en la mayoría de los tejidos. La inhibición de estas enzimas por los AINE puede inducir la aparición de reacciones adversas en partes muy diversas del organismo; la mayoría de las reacciones se producen a nivel gastrointestinal, renal, cardiovascular y hemático.

Las reacciones adversas gastrointestinales son las más frecuentes; incluyen reacciones leves como pirosis, dispepsia, dolor gástrico, diarrea o estreñimiento, hasta reacciones más graves como lesiones en la mucosa gástrica o duodenal y úlceras detectables por endoscopia. Estas reacciones se deben fundamentalmente a la inhibición de la COX-1 a nivel gastrointestinal, aunque como ya se ha comentado antes, no es el único

mecanismo. El riesgo de sufrir una alteración gastrointestinal depende del tipo y dosis de AINE utilizado. Los AINE de liberación retardada y los que tienen un tiempo de vida media largo, se asocian a un mayor riesgo de sangrado o perforación gastrointestinal (Masso Gonzalez y cols., 2010; Castellsague y cols., 2012). Las úlceras pueden variar desde erosiones superficiales pequeñas hasta perforaciones de todo el espesor de la mucosa. Pueden ser únicas o múltiples y estar acompañadas de sangrado; este a su vez puede dar lugar a anemia o incluso la muerte del paciente (Laine y cols., 2004). En un estudio prospectivo de seis meses de duración llevado a cabo en dos hospitales ingleses, se observó que los AINE fueron los fármacos que con más frecuencia estaban asociados a estas reacciones, en un 29,6% de todos los casos; fueron seguidos por los diuréticos en un 27,3% y warfarina en un 10,5%. Dentro de los AINE, el fármaco que más veces aparecía asociado a una reacción adversa fue la aspirina a dosis bajas, que supuso un 18% del total de ingresos -más de la mitad de los ingresos por AINE-, seguido por diclofenaco, ibuprofeno, rofecoxib, celecoxib, ketoprodeno y naproxeno. Las hemorragias gastrointestinales por AINE fueron la principal causa de ingreso hospitalario (Pirmohamed y cols., 2004). En otro estudio realizado en 10 hospitales españoles y 8 hospitales italianos que daban cobertura a más de 5 millones de habitantes, se estimó la incidencia de hemorragia gastrointestinal alta en 401,4 casos por millón de habitantes mayores de 18 años, siendo el 38% de esas hemorragias causadas por AINE. El riesgo individual para cada AINE era dosis dependiente y mayor en pacientes con antecedentes de úlcera péptica o sangrado gastrointestinal y en los tratados con antiagregantes (Laporte y cols., 2004). No sólo se incrementaba el riesgo de úlcera con la dosis, también se incrementaba con el uso simultáneo de más de un AINE.

Los efectos adversos cardiovasculares se han observado con mayor frecuencia con fármacos inhibidores de la COX-2. En un metaanálisis donde se comparaban los riesgos cardiovasculares de distintos AINE, se observó un mayor riesgo con rofecoxib (OR, 2,2; IC95%, 1,6-2,9); un ligero aumento del riesgo con diclofenaco y otros AINE más antiguos (OR, 1,4; IC95%, 1,2-1,7) pero no con celecoxib (OR, 1,1; IC95%, 0,9-1,2) o naproxeno (OR, 0,9; IC95%, 0,9-1,1) (McGettigan y Henry, 2006). Estos

datos fueron confirmados después por el mismo autor, que además identificó al naproxeno y al ibuprofeno a dosis bajas como los dos AINE con menor riesgo cardiovascular (McGettigan y Henry, 2011). En otro metaanálisis también se identificó al naproxeno como el AINE que menos daño cardiovascular producía (Trelle y cols., 2011). En otra revisión donde se incluyeron ensayos clínicos además de estudios observacionales, se observó un mayor riesgo de infarto de miocardio no mortal en pacientes tratados con AINE comparados con los que no fueron tratados con AINE (García Rodríguez y cols., 2011). Algunos polimorfismos en los genes de la enzima COX-1 y de la proteína C reactiva, podrían contribuir a aumentar la susceptibilidad de sufrir un síndrome coronario agudo en consumidores de AINE, aunque estos hallazgos aún no han confirmados con estudios en grandes muestras de pacientes (St Germaine y cols., 2010). La Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha realizado recientemente una revisión de diferentes estudios para establecer el perfil de seguridad cardiovascular de los AINE (AEMPS. Nota Informativa MUH (FV), 15/2012). De acuerdo con esta revisión, de los tres AINE más utilizados, el diclofenaco tendría un mayor riesgo cardiovascular de tipo aterotrombótico que el naproxeno o el ibuprofeno.

Además de las reacciones gastrointestinales y cardiovasculares, los AINE - en exposiciones crónicas- pueden provocar graves alteraciones renales, las cuales pueden poner en peligro la vida del paciente cuando éste cuenta además con otros factores de riesgo renal. Los AINE pueden provocar un aumento de la creatinina en suero dando lugar a hiperpotasemia, nefritis intersticial, proteinuria e insuficiencia renal aguda. Reducen la filtración glomerular por la disminución de la producción de PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> y en pacientes con la función renal disminuida, pueden provocar la retención de sodio y potasio produciendo edema e hipertensión e incluso llegar a producir insuficiencia renal (Suleyman y cols., 2007). Además del edema que aparece en el 3-5% de los tratados con AINE, también se produce hiperpotasemia, por lo que hay que tener especial cuidado en pacientes tratados con diuréticos ahorradores de potasio o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina-aldosterona (IECA). La nefropatía analgésica es una reacción adversa grave de los AINE que puede desembocar en una

necrosis papilar e insuficiencia renal crónica, que solo mejora con la retirada del fármaco y en caso contrario puede llegar a provocar una insuficiencia renal terminal o un carcinoma uroepitelial. En algunos estudios se identificó al fenoprofeno y a la indometacina como los AINE más nefrotóxicos (Harirforoosh y Jamali, 2009).

Los AINE pueden producir agranulocitosis y anemia aplásica, que son reacciones de carácter inmunológico o también hemorragias, por exceso de actividad antiagregante o episodios hemolíticos en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Asimismo producen reacciones de hipersensibilidad. Los síntomas de estas reacciones alérgicas van desde rinitis, angioedema, urticaria generalizada o asma bronquial hasta edema laríngeo, broncoconstricción, hipotensión y shock (Suleyman y cols., 2007).

## **Hemorragia Gastrointestinal**

Se entiende por hemorragia gastrointestinal (HGI) la pérdida de sangre en cualquier parte del tracto digestivo, siendo esta una de las principales causas de ingreso hospitalario por patología digestiva. Puede producirse de manera aguda, cuando se pierde una gran cantidad de sangre en poco tiempo, o crónica, cuando las cantidades son pequeñas durante un largo periodo de tiempo. Son cinco las manifestaciones de una hemorragia gastrointestinal según su localización, volumen de sangrado y velocidad del tránsito intestinal: la hematemesis, que son vómitos de sangre roja fresca o restos hemáticos digeridos, "en posos de café"; las melenas, caracterizadas por heces negras, malolientes y pastosas; la hematoquezia, que es una expulsión por el ano de sangre roja o granate; las pérdidas ocultas que se detectan a través de la prueba de guayacol; y los síntomas de anemia o hipovolemia, como mareos, desmayos, síncope, angina de pecho o disnea. Según el tramo del aparato digestivo en el que se produzca la lesión, se habla de HGI alta cuando ocurre entre el esfínter superior esofágico y el ángulo de Treitz (curva pronunciada entre el duodeno y el yeyuno), o HGI baja si se produce después de este ángulo y sobre todo en el colon.

### ***Hemorragia gastrointestinal alta***

La HGI alta es una reacción grave y frecuente, se estima que la incidencia por cualquier causa oscilaría entre 37-172 casos por 100.000 adultos y año (Rockall y cols., 1995; Laporte y cols., 1995; Loperfido, 1995; Longstreth, 1995; Blatchford y cols., 1997; Van Leerdam y cols., 2003). En un estudio realizado en bases de datos de 4 países europeos, se obtuvo una incidencia de entre 39 y 109 casos por 100.000 adultos y año (Coloma y cols., 2011). En Estados Unidos tras dos décadas de permanecer estable, en unos 80 casos por 100.000 adultos y año, la incidencia de HGI ha disminuido a unos 60 casos por 100.000 adultos y año (Laine y cols., 2012). En España se estima una incidencia de 34 casos por 100.000 adultos y año (Alvarez-Ibanez y Guerra-Garcia, 2012).

La úlcera péptica sangrante, en estómago o duodeno, es la principal causa de HGI alta, responsable del 50% de los casos. El sangrado por úlcera duodenal es el doble de frecuente que por úlcera gástrica. Le siguen los desgarros de Mallory-Weiss que representan el 5-15% de los casos; las varices esofágicas que oscilan entre un 5 y un 30% de los casos; la gastropatía hemorrágica como la producida por AINE o alcohol y la esofagitis erosiva, que produce HGI leves. La edad avanzada (>60 años), el sexo masculino y antecedentes de patologías graves, han sido identificados como los principales factores de riesgo para desarrollar una hemorragia gastrointestinal alta por AINE (Van Leerdam, 2008). Se ha estimado que alrededor del 40% de las hospitalizaciones por HGI alta que se producen en nuestro país son debidas a los AINE, y un 10% de estas hospitalizaciones terminan en muerte por sangrado o perforación (Laporte y cols., 1991; Laporte y cols., 2004). Aunque la mortalidad en Europa, América y Asia ha permanecido estable durante la pasada década, en torno al 3-14% (Van Leerdam, 2008), algunos estudios más recientes apuntan a una disminución de la mortalidad y a una evolución más favorable de los pacientes hospitalizados por HGI alta (Chiu y Sung, 2010).

Entre el 7 y el 16% de los pacientes hospitalizados que han sufrido una HGI alta padecen un segundo episodio hemorrágico (Van Leerdam y cols., 2003); la edad avanzada, el sexo femenino, los antecedentes de patologías graves, la ingesta de varios fármacos, las hospitalizaciones durante periodos largos de tiempo y la úlcera péptica no relacionada con la infección por *Helicobacter pylori*, son los principales factores de riesgo que se han asociado a una mayor probabilidad de tener un segundo episodio de sangrado. La mortalidad por un segundo sangrado se estimó en un 30,3% (Cohen y cols., 2007).

## **Factores ambientales o exógenos y riesgo de hemorragia gastrointestinal**

La mucosa gástrica constituye una barrera natural cuya integridad depende tanto de factores endógenos como de factores exógenos. El ácido clorhídrico, la bilis o la pepsina son factores endógenos que en condiciones normales no dañan esta estructura, aunque un exceso en la producción de cualquiera de ellos podría hacerlo. También la presencia de determinados factores exógenos como los AINE, las toxinas producidas por *Helicobacter pylori*, el alcohol o el tabaco, pueden provocar la pérdida de esta barrera protectora. Sin embargo, a través de la secreción de moco y de bicarbonato, la mucosa ejerce un mecanismo de defensa contra estas agresiones externas; también las prostaglandinas y el óxido nítrico contribuyen al mantenimiento de la integridad del epitelio gástrico.

***Helicobacter pylori*** La infección por *Helicobacter pylori* se considera un factor etiológico ambiental para la aparición de úlceras gástricas y duodenales así como un factor de riesgo para la aparición de cáncer gástrico. El tratamiento erradicador de esta bacteria consiste en la administración al paciente de dos antibacterianos, amoxicilina y metronidazol o claritromicina, y un inhibidor de la bomba de protones, durante dos semanas. Este tratamiento erradicador es fundamental para prevenir una segunda hemorragia en pacientes en tratamiento preventivo de enfermedad cardiovascular con aspirina (Chan y cols., 2001).

Las personas infectadas por *Helicobacter pylori* y que además son usuarios de AINE, presentan un efecto sinérgico de estos dos factores de riesgo ambientales en la aparición de hemorragias. En un metaanálisis se estimó que el riesgo de úlcera péptica hemorrágica era mayor en los pacientes con infección por *Helicobacter pylori* y que además eran tratados con AINE comparados con los pacientes sin estos factores de riesgo (OR, 61,3; IC95%, 9,9-373). Estos dos factores aparecían como factores de riesgo independientes de hemorragia, *Helicobacter pylori* (OR, 1,8) y AINE (OR, 4,8) (Huang y cols., 2002).

**Consumo excesivo de alcohol** El consumo excesivo de alcohol produce en el aparato digestivo la erosión directa de la mucosa intestinal, y como consecuencia se produce una alteración en la absorción de nutrientes, sodio y agua, todo esto condiciona una mayor propensión a sufrir diarreas, sangrados e infecciones bacterianas (Bode y Bode, 2003). Además, aumenta el riesgo de hospitalización por la aparición de episodios de hemorragia gastrointestinal alta, hepatitis y pancreatitis (Lembke y cols., 2011). La ingesta de grandes cantidades de alcohol de manera crónica provoca también una alteración en la función y el número de plaquetas, reversible con la abstinencia, y puede contribuir a la diátesis hemorrágica asociada al alcoholismo crónico y al aumento de la incidencia y recurrencia de hemorragia gastrointestinal (Mikhailidis y cols., 1986).

**Exposición a inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS)** Desde que se publicó el primer estudio de casos y controles en el que se identificó a los ISRS como un factor de riesgo relacionado con la HGI alta (De Abajo y cols., 1999), muchos otros estudios se han llevado a cabo buscando esta asociación. En la tabla 2 se resumen estos estudios, cuatro de ellos encontraron una fuerte asociación (riesgo relativo mayor de 2), en cinco una asociación intermedia (riesgo entre 1 y 1,7), otros cinco no encontraron asociación, y dos no eran comparables (Carvajal y cols., 2011).

Tabla 2. Estudios sobre asociación entre exposición a ISRS y HGI alta

Estudio (año)	n	OR ajustada (IC 95%)
<i>Retrospectivos</i>		
De Abajo y cols. (1999)	11,651	3,0 (2,1-4,4)
Tata y cols. (2005)	64,417	2,4 (2,1-2,7)
Van Walraven y cols. (2001)	317,824	3,0 (2,6-3,6)
Dalton y cols. (2003)	26,005	3,6 (2,7-4,7)
Wessinger y cols. (2006)	1,579	1,3 (0,8-1,9)
Meijer y cols. (2004)	1,003	2,1 (0,6-8,3)
Helin-Salmivaara y cols. (2007)	50,971	1,3 (1,1-1,5)
De Abajo y cols. (2008)	11,321	1,6 (1,2-2,1)
Opatmy y cols. (2008)	44,199	1,3 (1,1-1,6)
Barbui y cols. (2009)	2,998	1,3 (0,9-1,9)
Targownik y cols. (2009)	70,142	1,4 (1,1-1,9)
Dall y cols. (2009)	36,852	1,7 (1,5-1,9)
<i>Prospectivos</i>		
Dunn y cols. (2000)	237,609	1,2 (0,9-1,7)
Vidal y cols. (2008)	9,841	1,2 (0,9-1,7)
Lewis y cols, (2008)	2,245	2,1 (1,3-3,3)
Carvajal y cols. (2009)	1,939	1,1 (0,6-2,0)

Los primeros metaanálisis que se realizaron con estudios observacionales, obtuvieron unos valores altos de riesgo de HGI alta por ISRS, OR de 2,4 (IC95%, 1,4-3,8) para los pacientes expuestos a ISRS y de 6,3 (IC95%, 3,4-11,8) para los pacientes expuestos a ISRS y AINE. Es decir, los ISRS incrementarían a más del doble el riesgo de hemorragia (Loke y cols., 2008). En cambio, estudios más recientes han estimado unos valores más bajos de riesgo -OR menor de 2-, por lo que debe de haber otros factores

de riesgo implicados en su aparición como la exposición a otros fármacos (AINE, anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios y corticoides) y también la edad avanzada del paciente (De Abajo, 2011; Carvajal y cols., 2011). Este efecto, se ha intentado explicar por la actividad antiagregante plaquetaria de los ISRS sumada a la acción propia de los AINE (Yuan y cols., 2006; Mort y cols., 2006; Dall y cols., 2009). Y también por la presencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes tratados con ISRS (Dall y cols., 2011).

**Exposición a anticoagulantes orales** Los derivados cumarínicos, acenocumarol y warfarina, actúan como antagonistas de la vitamina K, impidiendo que se inicie la cascada de la coagulación. Se metabolizan a través del citocromo P450, por la isoenzima CYP2C9 y son muchas las interacciones que pueden producirse con otros medicamentos, en especial con los AINE, siendo las hemorragias la principal reacción adversa que producen (AEMPS. Ficha técnica del Sintrom®). Battistella y colaboradores realizaron un estudio de casos de HGI alta y controles, en ancianos tratados con warfarina y AINE, incluidos celecoxib y rofecoxib, cuya conclusión fue que aumentaba de igual manera el riesgo de HGI alta en pacientes ancianos tratados con warfarina y un AINE cualquiera que en tratados con warfarina y un inhibidor selectivo de la COX-2 (Battistella y cols., 2005).

## **Factores genéticos o endógenos y riesgo de hemorragia gastrointestinal**

Además de los factores exógenos o ambientales, previamente comentados, existen otros factores endógenos o genéticos inherentes a cada individuo cuya presencia podría estar relacionada con una mayor susceptibilidad a desarrollar una hemorragia. Se considera que solo el 0,1% de los tres mil millones de nucleótidos que forman parte del genoma humano es responsable de la variabilidad interindividual. Se denomina polimorfismos a las variaciones en un gen que aparecen con una frecuencia superior al 1% en la población normal. Estos polimorfismos pueden ser los llamados SNP (*single nucleotide polymorphisms*, variaciones de un solo nucleótido), deleciones de nucleótidos, inserciones o repeticiones. Se caracterizan por su simplicidad, estabilidad, amplia distribución y alta frecuencia a lo largo de todo el genoma, siendo por todo ello unos marcadores genéticos ideales. Si el polimorfismo está situado en la secuencia funcional de un gen, se verá alterada la proteína resultante; existirá así la posibilidad de que aparezcan individuos con distintos fenotipos. De esta manera, si el polimorfismo afecta a un gen de una enzima implicada en el metabolismo de fármacos, podrán aparecer distintos fenotipos en la población: metabolizadores lentos, normales o rápidos y ultrarrápidos. Estos fenotipos determinarán en parte el tipo de respuesta farmacológica y son el resultado de interacciones complejas entre genes y ambiente.

Así pues, en la aparición de HGI alta por AINE intervienen no solo los factores ambientales que se han descrito con anterioridad, sino que existe además un componente genético que se cree que puede predisponer a ciertos individuos a sufrir esta reacción adversa. La forma en que los AINE producen úlcera gastrointestinal estaría pues también asociada a la expresión de determinados genes en la mucosa gastrointestinal (Desai y cols., 2009). La variabilidad interindividual en la respuesta a fármacos, se podría encontrar en las posibles mutaciones en los genes de las enzimas que metabolizan los fármacos de interés (para los AINE, los genes de las isoenzimas CYP2C8 y CYP2C9 del citocromo P-450); en mutaciones en los genes de los receptores en los que actúan estos fármacos (receptores de las

plaquetas); o en mutaciones en enzimas que regulan las vías de formación de los principales factores implicados en la aparición o no de la hemorragia gastrointestinal (formación de óxido nítrico y prostaglandinas).

**Polimorfismos que afectan a las enzimas metabolizadoras de AINE (CYP2C9 Y CYP2C8)** La mayoría de los genes que codifican para las enzimas que metabolizan fármacos son polimórficos. Esto tiene como consecuencia un aumento, disminución o ausencia de la actividad enzimática y afecta tanto a la eficacia del fármaco como a su seguridad. Los polimorfismos en los genes de las enzimas CYP2C8 y CYP2C9 son comunes en muchas poblaciones humanas, afectan al metabolismo de los AINE y en ocasiones pueden producir un aumento en la biodisponibilidad de estos fármacos (Tabla 3); lo que daría lugar a la aparición de reacciones adversas con una mayor frecuencia. Se han identificado algunos de estos polimorfismos, *CYP2C8\*3*, *CYP2C9\*2 (R144C)* y *CYP2C9\*3 (I359L)*, asociados con una disminución del metabolismo de los AINE y por tanto con un aumento del riesgo de HGI alta (Carbonell y cols., 2010). Las variantes polimórficas *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*, en concreto, se encuentran en el 6-15% de los individuos caucásicos (Xie y cols., 2002; Mas y cols., 2005; Sanchez-Diz y cols., 2009).

Tabla 3. Principales enzimas implicadas en el metabolismo de AINE

Fármaco	Relevancia de CYP2C**	Enzima principal	Enzima secundaria
Aceclofenaco	Parcial	CYP2C9	Esterasas plasmáticas
Aspirina	Secundario	UGT1A6	CYP2C9
Celecoxib	Predominante	CYP2C9	
Diclofenaco	Parcial	CYP2C9	UGT2B7 y CYPs
Dipirona	Secundario	CYP2C8, CYP2C9	
Etoricoxib	Secundario	CYP3A4	

Fármaco	Relevancia de CYP2C**	Enzima principal	Enzima secundaria
Flurbiprofeno	Parcial	CYP2C9	
Ibuprofeno	Predominante	CYP2C8, CYP2C9	
Indometacina	Parcial	CYP2C9	Carboxil esterasas
Ketoprofeno	Secundario	UGTs	CYP
Lornoxicam	Predominante	CYP2C9	
Meloxicam	Parcial	CYP2C9	CYP3A4
Naproxeno	Secundario	UGT2B7	CYP2C9, CYP1A2
Parecoxib	Secundario	Hidrólisis a valdecoxib	CYP3A4, CYP2C9
Piroxicam	Predominante	CYP2C9	
Rofecoxib*	Secundario	UGT2B7, UGT2B15	CYP3A4, CYP2C9
Sulidac	Secundario	UGTs	CYP2C9
Tenoxicam	Parcial	CYP2C9	
Valdecoxib*	Secundario	CYP3A4	CYP2C9

\*Han sido retirados del mercado en España.

\*\*Relevancia de las enzimas CYP2C en el metabolismo primario de AINE:  
 Predominante: más del 90% del fármaco es metabolizado por CYP2C8 o CYP2C9.  
 Parcial: del 50% al 90% del fármaco es metabolizado por CYP2C8 o CYP2C9.  
 Secundario: Menos del 50% del fármaco es metabolizado por CYP2C8 o CYP2C9.

En un estudio realizado en pacientes caucásicos tratados con AINE (n= 218; 94 desarrollaron hemorragia), se estimó que el riesgo de hemorragia fue de 2,5 para los portadores de un alelo mutado (heterocigotos) en *CYP2C9* y de 3,7 para los portadores de los dos alelos mutados en *CYP2C9*, comparados con los portadores de la variante salvaje de *CYP2C9* (Martinez y cols., 2004). Esta asociación entre las variantes genéticas de *CYP2C9* y la

aparición de HGI podría haber resultado mayor si además se hubiera considerado la presencia de los polimorfismos en el gen *CYP2C8*, para los AINE que se metabolizan por ambas vías (Agundez y cols., 2009).

En otro estudio, llevado a cabo para conocer la influencia de los polimorfismos de *CYP2C9* en el riesgo de HGI por AINE, se realizó un análisis genético en pacientes tratados con AINE de los que 26 desarrollaron HGI y 52 no; fueron emparejados por edad y sexo. Se estudió la distribución de dos polimorfismos de la enzima *CYP2C9* (*CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*) y tras comprobar que existía diferente distribución en ambos grupos, se estimó el riesgo de hemorragia asociada a cada genotipo: [*CYP2C9 1\*/3\**, OR, 12,9 (IC95%, 2,9-57,9); *CYP2C9 1\*/2\**, OR, 3,8 (IC95%, 1,1-13,2)]; se calculó también la OR ajustada para el alelo *CYP2C9\*3*, (OR, 7,3; IC95%, 2,1-26,0). Los pacientes con estos genotipos tendrían, de acuerdo con este estudio, un mayor riesgo de HGI si son tratados con AINE que se metabolicen a través de la enzima *CYP2C9* (Pilotto y cols., 2007). En otro estudio que comparaba de la misma manera pacientes tratados con AINE con hemorragia (n=134) y sin hemorragia (n=177), la determinación genética de la presencia de las variantes polimórficas *CYP2C8\*3* y *CYP2C9\*2* simultáneamente reflejó un riesgo de hemorragia mucho mayor (OR, 3,7; IC95%, 1,6-8,9) que cuando se valoraban las mismas variables por separado en pacientes que estuvieran siendo tratados con AINE que se metabolizasen por esas vías [*CYP2C8\*3*, OR, 1,4 (IC95%, 0,4-4,7); *CYP2C9\*2*, OR, 0,7 (IC95%, 0,2-2,5)] (Blanco y cols., 2008). En uno de los análisis del estudio Emphogen (n=1942), se estimó para la HGI una OR de 19,9; IC95%, 7,4-53,1 en el grupo de la variante *CYP2C9\*3*. (Figueiras y cols., 2013, en prensa)

**Polimorfismos que afectan a las enzimas que intervienen en la síntesis de prostaglandinas. Polimorfismos en el gen COX-1**

Las enzimas que intervienen en la síntesis de prostaglandinas son las prostaglandina endoperóxido sintasas (PTGS) o ciclooxigenasas (COX). De ellas, la isoenzima mayoritaria que se expresa de forma constitutiva en la mucosa gástrica es la PTGS-1 o COX-1 (ver páginas anteriores). Esta enzima compuesta por 576 aminoácidos, tiene diferentes funciones a nivel renal, gastrointestinal y plaquetario. El gen que la codifica se encuentra localizado en el cromosoma 9 (9q32-33.3), con una longitud aproximada de 22 kb y formado por 11 exones.

Lee y cols. (2007) secuenciaron el gen *COX-1* en 92 individuos de diferente origen étnico e identificaron hasta 45 polimorfismos genéticos. De los cuales solo 7 producían un cambio funcional de la proteína, entre ellos estaba el polimorfismo *C50T* (rs3842787), que determina el cambio del aminoácido prolina por leucina en posición 17 de la proteína, lo que altera su función. Además, este polimorfismo está en completo desequilibrio de ligamento con otro polimorfismo en la región promotora del gen, el polimorfismo *A-842T*, con el que forma un haplotipo. También realizaron estudios *in vitro* en células no humanas que mostraron que la actividad metabólica de algunas de estas variantes había disminuido significativamente en comparación con la actividad metabólica de la variante salvaje. Al realizar estudios de inhibición enzimática con indometacina, se observó que cuando estaban presentes las variantes *C50T* y *G230S*, las enzimas necesitaban una menor concentración inhibitoria, sugiriendo que estas variantes aumentaban significativamente la sensibilidad de la enzima a la inhibición por indometacina (Lee y cols., 2007). La conclusión fue que los individuos portadores de las variantes alélicas *C50T* o *G230S* podrían ser más susceptibles de sufrir reacciones adversas asociadas a los AINE, aunque esta conclusión debería ser comprobada en estudios *in vivo*. En otro estudio llevado a cabo en 38 voluntarios sanos de población caucásica de Estados Unidos, se identificaron 9 SNP funcionales (Halushka y cols., 2003); tras secuenciar el ADN, purificar las plaquetas y ver la actividad enzimática de la *COX-1* en plaquetas, no se observó ninguna variación común que afectase a la función de la enzima; que el haplotipo heterocigoto *A-842G/C50T* se

asociaba con una mayor inhibición de la síntesis de  $\text{PGH}_2$  en pacientes tratados con aspirina, comparado con la variante normal y que los niveles bajos de COX-1 plaquetaria podrían ser la explicación al mecanismo por el cual hay una sensibilidad mayor a aspirina en los individuos heterocigotos que en los portadores de la variante normal —el 18% de la muestra presentaban ese haplotipo. Por lo que cabría esperar que los portadores, heterocigotos y homocigotos, de la variante polimórfica tuviesen mayor riesgo de sufrir los efectos ulcerogénicos de los AINE.

En varios estudios realizados en población japonesa también se analizó la relación existente entre polimorfismos genéticos funcionales localizados en la región del promotor (*T-1676C* y *A-842G/C50T*) del gen *COX-1* y diferentes patologías gastrointestinales (Arisawa e Hirata, 2007; Arisawa y cols., 2007). En todos los estudios se observó que el polimorfismo *A-842G/C50T* no se encontraba presente en la población japonesa. Se observó que el alelo *T* del polimorfismo *T-1676C* estaba relacionado significativamente con el desarrollo de úlcera gástrica en pacientes no expuestos a AINE y con úlcera gastroduodenal en expuestos a AINE, siendo esta una asociación significativa y relacionada con el número de alelos *-1676T* presentes en el individuo (OR, 5; IC95%, 1,6-21,1). Ese mismo polimorfismo *T-1676C* se relacionó también significativamente con dispepsia funcional en mujeres japonesas (OR, 4,1; IC95%, 1,1-14,4) y sin embargo su presencia no estaba relacionada con un mayor riesgo de colitis ulcerosa (Arisawa y cols., 2008a; Arisawa y cols., 2008b).

En la actualidad, se utiliza con profusión la aspirina a dosis bajas; el uso de dosis bajas de aspirina para la prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular y cerebrovascular también se ha relacionado con la aparición de hemorragia gastrointestinal (Alvarez-Sabin y cols., 1997). Los factores de riesgo en estos pacientes serían los mismos que con otros AINE: antecedentes de úlcera; edad avanzada; uso simultáneo de anticoagulantes, corticoides u otros AINE e infección por *Helicobacter pylori* (Nardulli y Lanás, 2009). La existencia de una COX-1 más sensible a la acción de la aspirina y otros AINE, que daría lugar a una disminución en los niveles de prostaglandina sintetizados, podría también explicar la aparición

de úlceras en la mucosa gastrointestinal. En la revisión realizada por Shiotani y colaboradores (2010) se recogen todos los polimorfismos que se han asociado con la aparición de úlceras por aspirina en distintas poblaciones: En población japonesa los polimorfismos *T-1676C* del gen *COX-1*, los polimorfismos *C-863A*, *T-1031C* y *C-857T* del gen *TNF- $\alpha$*  y los polimorfismos *T-31C* y *C-511T* del gen de la *IL- $\beta$* ; en población inglesa e italiana polimorfismos de *CYP2C9* y en población española el polimorfismo *IL-1RN\*L/\*2* (Shiotani y cols., 2010).

A diferencia de los estudios comentados, otros estudios no encontraron un mayor riesgo de alteraciones gastrointestinales asociadas a la presencia de los polimorfismos *A-842G* o *C50T* en el gen *COX-1* (Van Oijen y cols., 2006; Pettinella y cols., 2009). El haplotipo *A-842G/C50T* aparece como protector del riesgo de desarrollar sangrado, aunque este valor no es significativo (OR, 0,7; IC95%, 0,2-3) (Van Oijen y cols., 2006); tampoco se encontró asociación entre el haplotipo *C50T/A-842G* y una mayor sensibilidad a aspirina (Pettinella y cols., 2009).

***Polimorfismos que afectan a las enzimas liberadoras de óxido nítrico. Polimorfismos en el gen eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial)***

El óxido nítrico (NO) es una de las moléculas más estudiadas. Con anterioridad, cuando no se conocía su existencia, fue denominado "factor relajante derivado del endotelio" (de las siglas en inglés EDRF), más tarde se identificó como NO, y se comprobó su papel fundamental en el mantenimiento de la presión sanguínea (Moncada y cols., 1991) En 1998 se concedió el Premio Nobel de Medicina a Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad precisamente por sus descubrimientos sobre el papel del NO en el sistema cardiovascular (Pincock, 2009). El NO, además de ejercer su principal acción a nivel vascular produciendo vasodilatación y contribuyendo al mantenimiento de la presión sanguínea, interviene en el sistema nervioso central como neurotransmisor y en el sistema nervioso periférico, donde hay una clase de nervios no-adrenérgicos y no-colinérgicos que producen vasodilatación a través de un mecanismo dependiente de NO. También regula varias funciones del tracto gastrointestinal, respiratorio y

genitourinario y contribuye al control de la agregación plaquetaria y a la regulación de la contractilidad cardíaca. Todas estas acciones están mediadas por la activación de una guanilato ciclasa soluble y el consiguiente aumento en la concentración de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) en las células diana. Además, es producido en gran cantidad durante las reacciones de defensa e inmunidad, comportándose como agente citotóxico y citostático (Moncada y Higgs, 1993). El NO se produce en las células a partir de L-arginina, gracias a la acción de una familia de enzimas, las óxido nítrico sintasas (NOS), que catalizan la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidinio de la L-arginina, que se convierte en L-citrulina, a través de dos reacciones de monooxigenación, produciendo N<sup>w</sup>-hidroxi-L-arginina como intermediario (Moncada y cols., 1991).

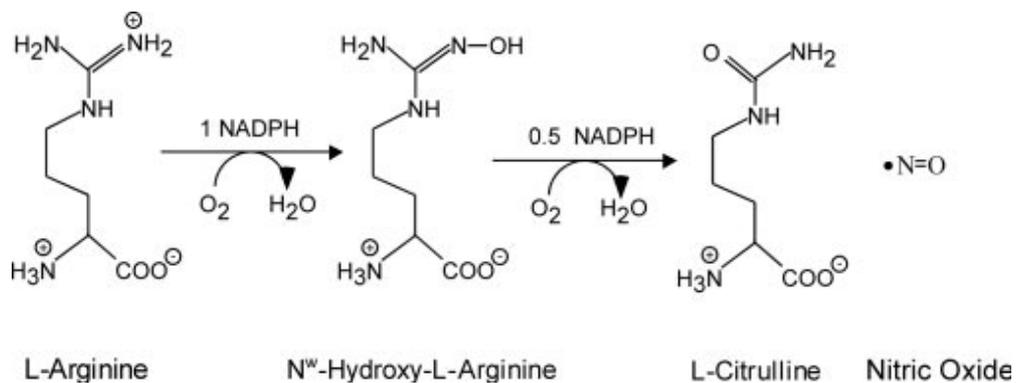


Figura 4. Esquema de la ruta biosintética del NO

Todas las óxido nítrico sintasas estudiadas hasta ahora requieren tres sustratos para actuar: L-arginina, NADPH y O<sub>2</sub>, y de cinco cofactores o grupos prostéticos: FAD, FMN, tetrabiopterina (H<sub>4</sub>B) y hemo y además son dependientes de calcio (Nathan y Xie, 1994). Dos características importantes de estas enzimas son que la unión de NO al hierro del grupo hemo provoca el bloqueo de la actividad enzimática y que la presencia el cofactor tetrahydrobiopterina (H<sub>4</sub>B), que es el donador de electrones para el grupo hemo-oxígeno, es esencial para la actividad enzimática (Li y Poulos, 2005). Las óxido nítrico sintasas en su forma activa son homodímeros, es

decir, dos cadenas idénticas de aminoácidos que forman cada una un monómero de peso molecular alrededor de 150 kDa.

En las células humanas se han identificado 3 isoformas, que son producto de tres genes distintos situados en cromosomas distintos y que tienen un 40-50% de homología entre ellas y las enzimas del citocromo P-450 (Murad, 2006). Dos de estas enzimas son constitutivas cNOS, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y una inducible, la iNOS, que se expresa en respuesta a determinados estímulos. Las formas constitutivas producen NO en pequeñas cantidades y en periodos cortos y la inducible actúa durante periodos largos y produce grandes cantidades. La mayor parte del NO circulante en la sangre es sintetizado por eNOS, presente en el endotelio vascular y en las plaquetas; la disponibilidad y el carácter de esta enzima eNOS depende de la regulación de la expresión del gen *eNOS* situado en el cromosoma 7q35-36 (Nathan y Xie, 1994). Se han descrito varios polimorfismos en el gen *eNOS*, entre ellos la repetición de una secuencia de 27 pares de bases en el intrón 4. Se piensa que los niveles de NO en plasma están regulados genéticamente por variaciones alélicas en el gen *eNOS*, y más en concreto, el 25% del NO plasmático depende del polimorfismo *27 pb 4b/4a* (Wang y cols., 1997). Los diferentes genotipos (*b/b*, *b/a* y *a/a*) pueden ser visualizados según el tamaño de las bandas que aparecen en gel de agarosa. Si aparece una banda de 420 pb, se trata del alelo normal (fragmento con 5 repeticiones de 27 pares de bases cada una, "alelo *b*") y si aparece una banda de 393 pb, se trata del alelo mutado, "alelo *a*" formado por 4 repeticiones de 27 pb cada una (Nath y cols., 2009). Los posibles genotipos resultantes de la combinación de estos alelos y su distribución han sido descritos para diferentes poblaciones (Zintzaras y cols., 2006). En la tabla 4 se recogen algunos ejemplos de estudios en los que se ha descrito esta distribución (Kim y cols., 2007).

Tabla 4. Distribución de los genotipos de *eNOS 4b/4a*

Genotipo	Italianos (n=537)	Ingleses (n=600)	Japoneses (n=119)	Coreanos (n=222)
4b/4b	71,7%	72,8%	81,5%	77%
4b/4a	25,7%	24,4%	18,5%	18%
4a/4a	2,6%	2,9%	0	0

Se han llevado a cabo diversos estudios que pretendían conocer la relación entre los polimorfismos de *eNOS* y diferentes enfermedades, entre ellas la enfermedad arterial coronaria, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 1, nefropatía diabética, asma o hemorragia subaracnoidea (Yanamandra y cols., 2005; Zintzaras y cols., 2006; Tanus-Santos y Castella-Filho, 2007). Sin embargo, hay muy pocos estudios sobre la asociación de polimorfismos de *eNOS* y la HGI por AINE. En un estudio llevado a cabo por Wang y cols. (1996), se observó un mayor número de homocigotos para el alelo *a* en pacientes con enfermedad arterial coronaria grave y con antecedentes de infarto de miocardio. Por lo que sugirieron que este alelo se relacionaría con una mayor predisposición a trastornos del endotelio.

El NO interviene en el mantenimiento del flujo sanguíneo de la mucosa gastrointestinal y de su integridad. Comparte así funciones con las PG en la protección de la mucosa, de tal manera que un cambio en los niveles de uno de estos factores conlleva a la elevación de los niveles del otro. El NO es crucial en el mantenimiento de la integridad gastrointestinal, cuya lesión es la principal limitación del uso de los AINE (Lanas, 2008). En efecto, la administración exógena, como en el caso de tratamiento con nitrovasodilatadores (nitroglicerina y nitratos orgánicos) previene o reduce el riesgo de HGI alta por AINE (OR, 0,5; IC95%, 0,2-0,9) (Lanas y cols., 2000).

Se ha estudiado en población española (88 casos de hemorragias y 108 controles), la relación entre un polimorfismo consistente en varias repeticiones de una secuencia de 27 pares de bases en el intrón 4 del gen eNOS y la HGI alta por dosis bajas de aspirina, además de otros polimorfismos (Piazuelo y cols., 2008). El resultado fue que los portadores del alelo *a* presentaban protección frente a la HGI alta por aspirina a dosis bajas (OR, 0,4; IC95%, 0,2-0,8). También se identificaron como factores protectores los nitrovasodilatadores (OR, 0,3; IC95%, 0,1-0,7), los antisecretores (OR, 0,15; IC95%, 0,05-0,47) y como factores de riesgo la infección por *Helicobacter pylori* (OR, 3,1; IC95%, 1,2-7,7), el consumo de alcohol (OR, 5; IC95%, 1,9-13,7) y la historia previa de úlcera (OR, 13,4; IC95%, 3,8-47,6). Estos mismos autores encontraron una asociación entre este mismo polimorfismo y un menor riesgo de HGI en pacientes con úlcera duodenal en un estudio anterior (OR, 0,5; IC95%, 0,2-0,9) (Serrano y cols., 2002). Además hallaron una mayor proporción de genotipos *b/b* y una menor frecuencia del alelo *a* en pacientes con úlcera duodenal sangrante.



## II. Objetivos



1. Conocer la posible asociación entre dos polimorfismos en el gen *COX-1* y el riesgo de HDA tras exposición a AINE
2. Conocer la posible asociación entre un polimorfismo en el gen *eNOS* y el riesgo de HDA tras exposición a AINE
3. Describir la distribución de las diferentes variantes polimórficas del gen *COX-1* en la población estudiada
4. Describir la distribución de las diferentes variantes polimórficas del gen *eNOS* en la población estudiada



### III. Material y método



## Diseño del estudio

Para conocer la asociación entre la hemorragia gastrointestinal y diversos factores de riesgo considerados, se realizó un estudio de casos y controles. Se formaron para su comparación dos grupos de individuos según tuvieran la enfermedad de interés (casos) o no la tuvieran (controles); la enfermedad de interés para su estudio fue la hemorragia gastrointestinal alta diagnosticada a través de una endoscopia. Los grupos así formados se compararon respecto a las exposiciones y a las características constitucionales previas con el fin de conocer si estas se relacionaban o no con la enfermedad de interés.

El objetivo de este tipo de estudios es obtener un estimador de la fuerza de la asociación entre uno o varios factores de riesgo y la enfermedad o el desenlace de interés; este estimador se denomina *odds ratio* o razón de ventajas (OR) y se representa con la letra griega psi ( $\Psi$ ). Cuando una pequeña proporción de la población está afectada por una enfermedad, como ocurre en el caso de enfermedades poco frecuentes, el número de casos expuestos (a) es muy pequeño respecto al de controles expuestos (b); y el número de casos no expuestos (c), muy pequeño también respecto al de controles no expuestos (d). En esta situación, el valor de la OR se

aproxima a,  $(a \times d) / (b \times c)$ . La OR indica cuántas veces más está expuesto los casos respecto a los controles. En la tabla 5 se muestra con más detalle la organización de los resultados en una tabla 2x2 y el correspondiente cálculo del riesgo.

Tabla 5. Tabla 2x2 empleada para el cálculo de la OR

	Presencia de enfermedad	Ausencia de enfermedad	Total
Expuestos	a	b	a+b
No expuestos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Una *odds ratio* igual a 1, o que no difiera significativamente de 1, indica que no habría asociación entre el factor considerado y la enfermedad estudiada. En cambio, un valor de la *odds ratio* superior a 1 indicaría que ese factor estaría asociado con la enfermedad como factor causal; lo contrario ocurriría si el valor de la *odds ratio* fuese inferior a 1, en este caso lo consideraríamos factor protector. El valor de la *odds ratio* debe acompañarse siempre de un intervalo de confianza, en general del 95%. Este intervalo de confianza es otro indicador de la precisión de la estimación y de la significación estadística de la asociación, y proporciona mayor información que el valor del test de  $\chi^2$  y su probabilidad (p) asociada. Los resultados del análisis de asociación pues serán tanto más fiables cuanto menor sea el intervalo de confianza.

Uno de los inconvenientes de este tipo de estudios, es la posibilidad de introducir sesgos difíciles de detectar.

## Desarrollo del estudio

El periodo de identificación de pacientes de interés y de recogida de datos se extendió desde enero de 2004 hasta junio de 2006, si bien en algunos centros se finalizó la recogida de casos antes de dicha fecha. Por cada caso, se recogieron tres controles que fueron emparejados con los casos por edad (con una diferencia de más/menos 5 años), sexo y periodo estacional (más/menos 3 meses de la fecha de entrevista). En la tabla 6 se muestran los hospitales en donde se reclutaron los pacientes y se detallan sus características más relevantes. El hospital de Basurto, se incorporó más tarde, en junio de 2004.

Tabla 6. Características de los hospitales donde se identificaron y se reclutaron los pacientes del estudio

Hospital	Número de camas	Población de referencia
Hospital Xeral (Santiago de Compostela)	765	418.965
Hospital de Galdakao (Vizcaya)	439	300.000
Hospital de Basurto (Bilbao)	686	354.000
Hospital Vall d'Hebron (Barcelona)	1.400	300.000
Hospital Clínico Universitario (Valladolid)	700	260.946

## Selección de los casos

Se consideraron casos, para los fines de este estudio, aquellos pacientes mayores de 18 años, que presentaban alguno de los siguientes diagnósticos por endoscopia: *ulcus gástrico* (prepilórico, línea z); *ulcus pilórico*; *ulcus duodenal*; *erosiones cardiales*; *lesiones agudas de la mucosa gástrica - gastritis erosiva* (erosiones prepilóricas, línea z); *erosiones pilóricas o duodenitis erosiva*. Todos ellos con signos de sangrado reciente, atendiendo a criterios como coágulo rojo adherido a la úlcera, sangrado activo (rezuma sangre, en "jet" o "babeo") o vaso visible no sangrante en este momento.

No obstante, se consideraron diferentes tipos de exclusiones que se comentan a continuación.

*Exclusiones primarias* Se excluyeron aquellos pacientes menores de 18 años o quienes presentaran los siguientes diagnósticos: varices esofágicas y/o gástricas; neoplasia gástrica y/o duodenal (sin antecedentes previos de esta patología); síndrome de Mallory-Weiss; esofagitis; angiodisplasia; úlceras anastomóticas; diverticulitis; intoxicación aguda por alcohol; hernia de hiato; pápula. Tampoco se incluyeron los que presentaban antecedentes patológicos como discrasias hemáticas; neoplasias hematológicas; coagulación intravascular diseminada; hemodiálisis por insuficiencia renal crónica terminal; neoplasia gástrica/duodenal; síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), HIV+ en tratamiento con antirretrovirales en los últimos 3 meses; adicción a drogas por vía parenteral o tratamiento de deshabituación en los últimos 3 meses; neoplasia en tratamiento con citostáticos o radioterapia en los últimos 5 meses; HGI alta intrahospitalaria; HGI alta sin diagnóstico de endoscopia o quirúrgico desde el ingreso hasta el alta. Tampoco se incluyeron los portadores de sonda nasogástrica o percutánea y aquellos cuya residencia en el área de estudio fuera inferior a 3 meses.

*Exclusiones secundarias* Se excluyeron los casos que se produjeron durante los fines de semana o en periodos cortos de vacaciones y que hubieran sido dados de alta; los pacientes que fueron sometidos a endoscopia y ésta fue realizada con posterioridad a las 48 h del ingreso; aquellos pacientes que hubieran sido dados de alta en un hospital o hubieran acudido a un centro asistencial durante cualquiera de los 15 días previos a su ingreso; aquellos pacientes que por la gravedad de su estado no fuera posible entrevistarlos; los que presentaban alteraciones psíquicas como demencia y/o desorientación; los pacientes que fueran analfabetos; ciegos; sordos; aquellos pacientes que vivieran en una residencia o institución cerrada y no conocieran qué fármacos estaban tomando; los pacientes que rehusaran contestar la entrevista o no la realizaran en su totalidad y aquellos otros a los que no hubiera sido posible entrevistar dentro de los primeros 15 días desde el momento de su ingreso; asimismo, se excluyeron los fallecidos antes de poder ser entrevistados.

### **Selección de los controles**

Se consideraron controles adecuados para los casos identificados y seleccionados, los pacientes mayores de 18 años que acudían al hospital para ser sometidos a cirugía general para intervenciones programadas de procesos clínicos no relacionados con el consumo de AINE; también se incluyeron pacientes con intervenciones quirúrgicas programadas por procesos no dolorosos. Entre estos procesos cabe destacar: hernia inguinal o umbilical; adenoma de próstata en paciente sin sonda vesical desde 3 meses hasta 15 días antes de su ingreso; cataratas; septoplastia; varices en extremidades inferiores; lipomas y quiste en cuerdas vocales.

*Controles excluidos* Fueron excluidos del estudio aquellos pacientes, seleccionados como controles, que tenían una edad inferior a los 18 años y aquellos que presentaban alguno de los siguientes antecedentes patológicos: discrasias hemáticas; neoplasia hematológica; coagulación intravascular diseminada; hemodiálisis por insuficiencia renal crónica terminal; neoplasia gástrica/duodenal; síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), HIV positivo en tratamiento con antirretrovirales en los últimos 3 meses; adicción a drogas por vía parenteral o en tratamiento de deshabituación en los últimos 3 meses; neoplasia en tratamiento con citostáticos o radioterapia en los últimos 5 meses. Asimismo se excluyeron los pacientes portadores de sonda nasogástrica o percutánea; aquellos cuya residencia en el área de estudio fue inferior a 3 meses; los pacientes que estuvieran en estado grave; aquellos pacientes con alteraciones psíquicas como demencia y/o desorientación; los pacientes que fueran analfabetos; ciegos; sordos; aquellos pacientes que vivían en una residencia o institución cerrada y no conocieran los medicamentos que estaban tomando; los que rehusaron contestar el cuestionario o no lo contestaron en su totalidad; aquellos pacientes a los que no fue posible hacer la entrevista dentro de los primeros 15 días desde su ingreso; y los éxitus ocurridos antes de entrevistarlos.

## **Recogida de la información para el estudio**

La información recogida para el estudio provenía tanto de un cuestionario realizado por un monitor entrenado para tal propósito como de una muestra de sangre extraída al paciente para la realización de los estudios genéticos. Para proceder a la administración del cuestionario y a la toma de la muestra de sangre, se informaba previamente al paciente y se pedía su consentimiento por escrito.

### ***Cuestionario para la entrevista y variables recogidas***

La información fue recogida mediante una entrevista personal llevada a cabo por el monitor del estudio a los pacientes durante su ingreso en los hospitales participantes. La entrevista estaba basada en un cuestionario (anexo 1) que incluía entre otras cosas una anamnesis farmacológica (anexo 2) que se codificó de acuerdo a una guía establecida a tal efecto (anexo 3). Al finalizar la entrevista, se mostraba un catálogo de fotografías (*pront-cards*) con las presentaciones de los medicamentos más prescritos de interés para el estudio, que contenía: antidepresivos, analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos, antiulcerosos y antiagregantes plaquetarios (anexo 4). Todos los pacientes debían dar su consentimiento para ser entrevistados tras ser informados (Anexo 5). Una vez obtenido el consentimiento, el entrevistador completaba, con los datos suministrados por el paciente, un cuestionario estandarizado que contenía preguntas dirigidas sobre numerosos aspectos: datos generales del paciente; datos del último ingreso hospitalario o de la última vez que acudió a un centro asistencial; del curso natural de la enfermedad; de los síntomas que padeció en el último mes (solo casos); del tipo de control (solo controles); de sus antecedentes de patología gastrointestinal; de sus antecedentes familiares de sangrado gastrointestinal; antecedentes personales; anamnesis farmacológica relativa a los últimos 60 días y origen del consumo; hábito tabáquico; consumo de bebidas; parámetros bioquímicos y de coagulación. A toda esta información se le añadía el informe endoscópico y el diagnóstico CIE-9 en el momento del alta hospitalaria. Asimismo se

obtuvieron datos acerca de las personas presentes en la entrevista y se realizó una valoración subjetiva de la entrevista por parte del propio entrevistador.

Toda la información contenida en esta entrevista fue corregida, depurada e introducida en una base de datos diseñada a tal efecto (anexo 6). Esta base de datos utilizó el programa *Microsoft Office Access* con un entorno realizado en *Visual Basic*.

Para mantener el anonimato, a toda la información referente a un paciente, se le asignaba un código numérico único, de tal forma que durante el procesamiento de los datos no fuese posible asociarlos con ningún paciente determinado.

### ***Recogida y tratamiento de las muestras***

Además de la entrevista, a cada paciente incluido en el estudio, ya fuese caso o control, se le extrajeron dos tubos de sangre entera, uno con un volumen de 8 mL y con gel separador (que permite la obtención de suero) que se utilizó para la determinación de *Helicobacter pylori*, y otro, con un volumen 7 mL y con EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), para realizar las determinaciones genéticas. Las muestras de sangre destinadas al estudio genético fueron tratadas en cada centro para aislar leucocitos; el contenido de cada tubo de sangre entera se distribuía a su vez en dos tubos para obtener así dos pellets o conjunto de células de leucocitos del mismo paciente y utilizar uno de ellos para realizar los estudios genéticos y el otro quedaría almacenado por si hiciera falta material genético extra. A la espera de la realización de los análisis genéticos dichas muestras se almacenaban a  $-80^{\circ}\text{C}$  en cada centro participante. Para la obtención de los leucocitos, las muestras fueron sometidas a varios ciclos de centrifugación (3000 rpm durante 10 minutos) y de lavado con una solución de lisis de eritrocitos ( $\text{KHCO}_3$  10mM, EDTA 10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,7M a pH = 8) (dos veces) y otros dos lavados posteriores con PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, solución de las siguientes sales  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

Al igual que con la información introducida en la base de datos del estudio, para mantener la confidencialidad del paciente, a cada muestra resultante de leucocitos se le asignaba un código numérico, de forma que durante el proceso de análisis genético no fuese posible asociar el nombre del paciente con el número de la muestra.

## **Análisis genéticos**

Se pretendía identificar y cuantificar los genotipos de tres polimorfismos localizados en dos genes distintos, cuyas principales características se recogen en la tabla 7.

En cada centro participante se realizó la extracción y cuantificación del ADN. Las determinaciones genéticas se llevaron a cabo de manera centralizada en el Laboratorio de Genómica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. De los dos tubos con leucocitos, correspondientes a cada paciente, y que habían sido almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se descongelaba uno, primero a  $4^{\circ}\text{C}$  y luego a temperatura ambiente ( $+18^{\circ}\text{C}/+25^{\circ}\text{C}$ ) para evitar la ruptura espontánea de las cadenas de ADN. Después se llevaban a cabo los procesos de extracción y cuantificación del ADN.

Para la extracción del ADN contenido en la muestra se utilizó el kit comercial *QIAamp DNA blood mini kit (250)*<sup>®</sup> (Cat.no 51106), de la casa comercial QIAGEN en Alemania, basado en el método de extracción por columnas, según el protocolo estándar del fabricante (anexo 7). A partir de ese momento, se disponía de una solución madre de ADN purificado y concentrado, a partir de la cual y por dilución, se obtendrían las diferentes alícuotas con la concentración de ADN necesaria para realizar las determinaciones genéticas de los polimorfismos. Para cuantificar el ADN extraído, se medía la absorbancia de la muestra a 260 nanómetros (nm). La lectura espectrofotométrica nos proporcionaba la concentración de ADN en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que tenía la disolución madre.

Para llevar a cabo las determinaciones genéticas de interés, se obtuvieron alícuotas de la disolución madre de cada muestra con una concentración de 100 ng/μl.

Tabla 7. Técnicas de genotipado utilizadas y principales características de los polimorfismos de interés

	COX-1		eNOS
	C50T	A-842G	4b/4a
Técnica genotipado	PCR-rt, Sondas Taqman	PCR-rt, Sondas Taqman	SNaPshot
Secuencia	rs3842787	rs10306114	
Heterocigosidad	0,191	0,164	
MAF/MinorAlleleCount	T=0.0636/80	G=0.0604/76	
Cambio de aa	P17L	---	---
Región del gen	exon 2	promotor	intron 4
Proteína	COX-1	COX-1	eNOS
Localización cromosómica	9q32-q33.3	9q32-q33.3	7q35-36

### **Determinaciones genéticas**

Existen diferentes técnicas de genotipado de SNPs de acuerdo con las diferentes formas en que se lleve a cabo la amplificación, identificación y detección de esos SNPs. La mayoría de las técnicas de genotipado necesitan de una fase previa de amplificación de la zona genómica que contiene los SNPs que nos interesan. Esta amplificación se lleva a cabo a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite obtener un número ilimitado de copias de cualquier fragmento de ADN, incluso a partir de cantidades muy reducidas de ADN de partida. Una vez amplificada la secuencia del ADN que nos interesa, se lleva a cabo la detección e identificación de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio o mediante hibridación con sondas específicas (Costa, 2004). La técnica de la PCR está basada en la actividad enzimática de la ADN polimerasa, capaz de generar

una cadena de ADN complementaria a otra ya existente utilizando nucleótidos (adenina, guanina, timina y citosina) y una pequeña cadena de ADN unida a la cadena de la que queremos hacer copias complementarias ("primer" en inglés o cebador). La reacción se realiza en tres etapas y se repite durante varios ciclos, entre 20 y 40:

1. *Desnaturalización*: Calentamiento para la separación de las dos hebras de ADN mediante una incubación breve a una temperatura entre 68 y 97°C, que debe ser superior a la temperatura de fusión ( $T_m$ , *melting temperature* que es la temperatura a la que se desnaturaliza el 50% del ADN) de la región de ADN que se quiere amplificar.

2. *Templado (hibridación)*: Enfriamiento rápido por debajo de la  $T_m$ , de forma que se permite la hibridación de las hebras sencillas de ADN de interés con los dos *primers* (oligonucleótidos de cadena sencilla que, siendo cada uno de ellos complementarios a los dos extremos 3' de la región diana, ejercen de cebadores para la replicación del fragmento de ADN que se quiere amplificar). Generalmente se usan temperaturas de 37 a 65°C que se mantienen entre 10 y 120 s.

3. *Elongación (o replicación)*: Etapa de amplificación propiamente dicha (72-75°C), en la que la ADN polimerasa elonga los *primers*, empleando como molde ambas hebras originales y como sustrato los cuatro dNTPs (desoxi-nucleósidos trifosfato), hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real (PCR-rt) incluye la amplificación de una PCR clásica y, además, entre otras funciones, permite la cuantificación de ADN y/o la realización de una discriminación alélica de forma simultánea. La PCR-rt requiere de unos termocicladores que llevan incorporado un lector de fluorescencia que mide la fluorescencia emitida en cada uno de los viales para determinar la cantidad de ADN amplificado en cada momento. Los sistemas de detección de fluorescencia pueden ser de dos tipos:

a. *Agentes intercalantes*: Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El

incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este método permite la cuantificación de ADN, pero no la identificación de polimorfismos. El fluorocromo más empleado es el SYBR Green I®.

b. *Sondas de hibridación específicas*: Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las moléculas. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales. Las más utilizadas son:

- *Sondas TaqMan® (o sondas de hidrólisis)*: Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el aceptor, siempre y cuando ambos estén espacialmente próximos. Durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Luego la ADN-polimerasa *Thermus aquaticus* que tiene actividad 5' exonucleasa, al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, hidroliza el extremo libre de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador que, al no estar próximo al aceptor, emite fluorescencia que es captada por el lector (Figura 5).

- *Sondas Molecular Beacons*: Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptor en el extremo 3' y, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy próximos el uno del otro. En el proceso de la PCR, tal y como ocurre con las sondas TaqMan®, el donador emite fluorescencia.

- *Sondas FRET*: El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere

su energía al aceptor que, a su vez, emite fluorescencia (Costa, 2004).

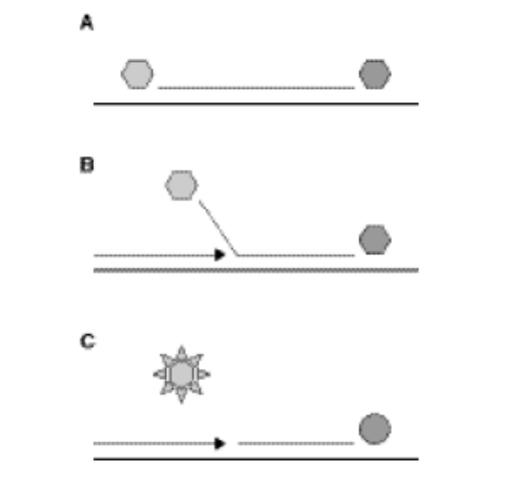


Figura 5. Mecanismo de las sondas de hidrólisis (TaqMan®). A: unión de la sonda a fragmento de ADN, B: alineamiento, extensión del cebador y desplazamiento de la sonda por la ADN polimerasa. C: emisión de fluorescencia

**Deteminación de SNPs mediante sondas TaqMan®** Para la determinación de los polimorfismos genéticos de la COX-1 se han utilizado sondas TaqMan®. Este tipo de ensayos requieren dos *primers* que permiten amplificar el fragmento diana del ADN y dos sondas TaqMan®, cada una específica para uno de los alelos (alelo 1 y alelo 2). Cada sonda TaqMan® lleva un fluorocromo donador diferente (en nuestro caso VIC® o FAM™), un MGB (*minor groove binder*) que permite bajar la  $T_m$ , permitiendo que la sonda se hibride antes que cualquier desoxinucleotido, y una molécula aceptor (NFQ = *nonfluorescent quencher*) que absorbe la fluorescencia emitida por el fluorocromo donador.

Una vez desnaturalizado el ADN, en la fase de hibridación, las sondas TaqMan® se unen a la hebra específica del alelo al que es complementario. Cuando la ADN polimerasa elonga los *primers*, la sonda TaqMan® hibridada se fragmenta, el fluorocromo donador y el NFQ se alejan, y éste último emite fluorescencia. En la figura 6 se muestra el mecanismo de determinación de SNPs mediante sondas TaqMan®.

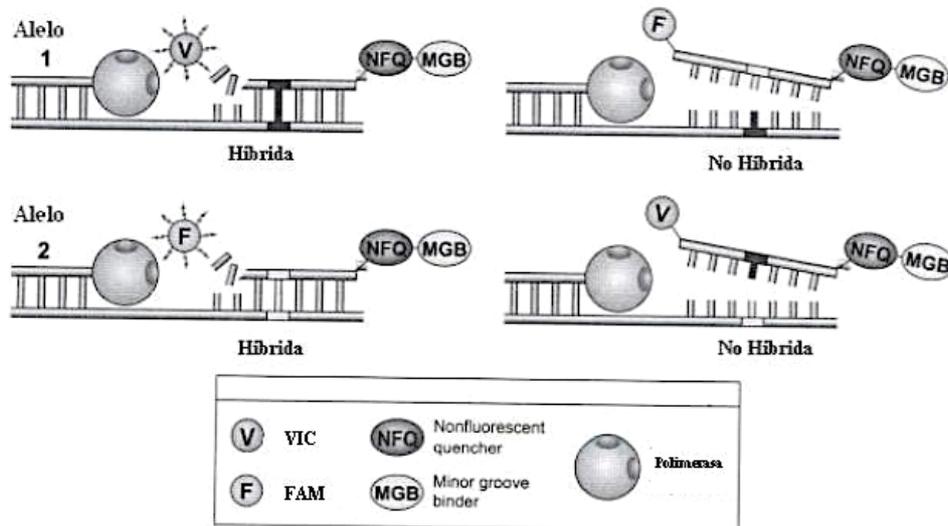


Figura 6. Mecanismo de determinación de SNPs mediante sondas TaqMan®

Si el termociclador sólo detecta señal para uno de los fluorocromos, indica que la muestra contiene ADN de un paciente que es homocigoto para ese alelo específico. Si el termociclador detecta señal para los dos fluorocromos, indica que la muestra contiene ADN de un paciente que es heterocigoto y por lo tanto, portador de los dos alelos. Si el termociclador sólo detecta señal para el otro fluorocromo, indica que la muestra contiene ADN de un paciente que es homocigoto para el otro alelo específico.

Las condiciones de PCR para las sondas Taqman y el termociclador de PCR-rt empleados en este estudio se especifican en el anexo 8.

### **Determinación de polimorfismos mediante análisis de fragmentos**

Cuando tenemos un fragmento corto de ADN que se repite varias veces consecutivamente, hablamos de VNTR (número variable de repeticiones en tándem). Para el estudio de este tipo de polimorfismos, una técnica muy empleada en genética es el análisis de fragmentos. El polimorfismo del gen de la eNOS es de este tipo, se trata de 4 o 5 repeticiones consecutivas de un fragmento de ADN de 27 pares de bases de tamaño.

El análisis de fragmentos, al igual que la secuenciación automática del ADN, está basado en electroforesis capilar y detección del ADN mediante fluorescencia. Para que los fragmentos de ADN puedan ser detectados deben marcarse durante su amplificación por PCR. Para ello uno de los cebadores estará unido a una molécula fluorescente. Se utilizan los mismos fluorocromos que en la secuenciación. La disponibilidad de distintas etiquetas fluorescentes, permite detectar y determinar el tamaño de distintos productos de PCR en una sola carrera electroforética. El software GeneScan® ofrece un análisis sencillo y rápido de los fragmentos obtenidos según los colores de los diferentes fluorocromos.

El polimorfismo detectado se debe a diferencias en el número de repeticiones en tandem. En la figura 7 se muestran los resultados de un análisis de fragmentos.

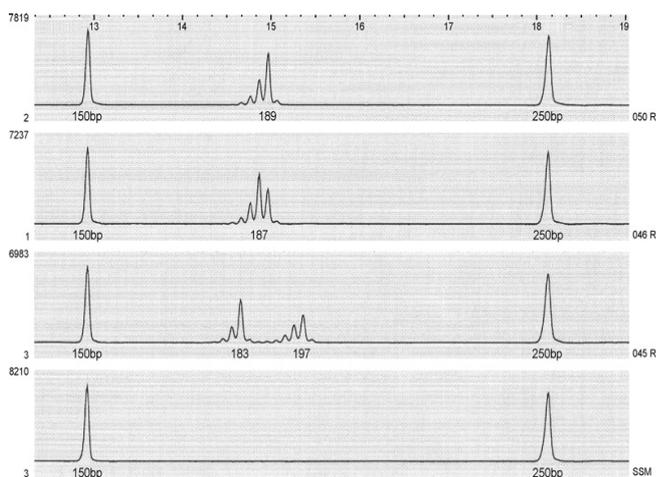


Figura 7. Resultado del análisis de fragmentos de tres muestras. Arriba, análisis de fragmentos en la muestra D, que es homocigota con 189 pb; en el medio arriba, análisis de fragmentos en la muestra E, que es homocigota con 187 pb; en el medio abajo, análisis de fragmentos en la muestra F, que es heterocigota con 183 y 197 pb; en la parte de abajo, tamaños moleculares estándares sin muestra de ADN (Tran y cols., 2004)

En nuestro estudio se repite un fragmento de 27 pares de bases, formando el alelo a si hay 4 repeticiones y el alelo b si hay 5 repeticiones.

Tanto los análisis genéticos de las variantes de la enzima eNOS como de los polimorfismos A-842G y C50T de la COX-1, se realizaron en el Laboratorio de Genómica de la Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

### ***Determinación de Helicobacter pylori***

A cada muestra contenida en el tubo con gel separador, se le realizó la determinación de la presencia de *Helicobacter Pylori* en suero, mediante la detección de IgG inmunespecífica por la técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*). El kit comercial utilizado a tal efecto fue H. pylori IgG ELISA. WAMPOLE® (ref.: 446400). De esta determinación se encargó el centro ubicado en el Hospital Xeral de Santiago de Compostela.

### **Análisis estadístico**

#### ***Equilibrio Hardy-Weinberg***

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg como control de calidad de los datos genéticos obtenidos. Se comprobó que la distribución de las frecuencias alélicas obtenidas en nuestra población coincidiera con las frecuencias alélicas esperadas para una población similar. Para ello se utilizaron los programas informáticos, R con el paquete estadístico SNPAssoc y el programa on-line SNPStats.

El principio de Hardy-Weinberg establece que “En una población mendeliana, en la que se dan los supuestos de apareamiento al azar, ausencia de mutación, selección y migración, y tamaño infinito, las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen estables generación tras generación”. Y además, si una población no está inicialmente en equilibrio, el equilibrio se alcanza tras una sola generación de apareamiento al azar.

### **Análisis de los datos**

El análisis estadístico de los datos recogidos se ha llevado a cabo usando los programas estadísticos SPSS (*Statistical Package for Social Science*) en su versión 17 y R. La base de datos original fue depurada para evitar errores. Se estudió cada variable desde un punto de vista univariante, para conocer sus valores, sus estadísticos descriptivos y su comportamiento; a partir de este análisis previo, se corrigieron los errores existentes. A continuación se llevó a cabo un análisis bivalente enfrentando cada una de las variables de interés frente a la variable respuesta, esto es, la condición de caso o de control. A partir de este análisis bivalente se determinó el grado de significación estadística de cada una de las variables implicadas, usando el análisis  $\chi^2$  para datos categóricos y el test t-Student para datos continuos. Siempre que el grado de significación fuera inferior a 0,05 se rechazó la hipótesis nula de ausencia de asociación estadística. Se consideraron varios puntos de corte para la categorización de variables. Se eligieron aquellos puntos de corte que correspondieron a una mayor asociación con la variable respuesta. Se evaluó la necesidad de emplear variables continuas o las mismas variables categorizadas. Cuando no pudo asegurarse un orden en la relación de las categorías creadas respecto a la variable respuesta, la representación continua fue descartada.

Para estudiar la relación entre las variables explicativas y la respuesta se construyó un modelo de regresión logística condicional multivariante. En primer lugar se elaboró un modelo de regresión logística univariante para cada uno de los posibles factores de riesgo de hemorragia. Todas aquellas variables con grado de significación estadística univariante menor que 0,2 fueron consideradas para la construcción del modelo definitivo. Para cada uno de los factores del modelo univariante se calculó su *odds ratio* univariante y su intervalo de confianza al 95%.

A continuación se desarrolló el modelo condicional multivariante. Para ello, como primer paso, el consumo o no de "AINE y salicilatos" fue introducida como variable en el modelo. A continuación, para el resto de los factores significativos en el paso anterior se construyó un modelo de regresión

logística condicional multivariante. Para cada uno de los factores del modelo definitivo se calculó su *odds ratio* y su intervalo de confianza al 95%.

Para el análisis de la interacción entre los factores genéticos y la exposición a AINE, se construyó un modelo de interacción donde las combinaciones de las variables genéticas y la exposición a los diferentes fármacos se consideraron como factores de riesgo. Este modelo se ajustó en función de los factores significativos obtenidos en el modelo anterior. Para cada una de los polimorfismos genéticos así como para el haplotipo de COX-1 del modelo definitivo se calculó su *odds ratio* y su intervalo de confianza al 95%.

## Otras consideraciones

**Consideraciones éticas** El protocolo del estudio, el cuestionario para la recogida de la información clínica y el consentimiento informado que debían firmar los pacientes, fueron sometidos a la consideración de los comités de ética de cada hospital participante en el estudio (anexo 9). Todos los pacientes fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito para poder consultar su historia clínica y recoger la información a través de la entrevista y de la muestra de sangre.

Se ha mantenido en todo momento la confidencialidad de los datos obtenidos tanto a través de la historia clínica del paciente como de los obtenidos a través del cuestionario y las muestras de sangre.

**Financiación** El estudio obtuvo financiación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (expediente nº PI021364). Los estudios genéticos fueron financiados por el Centro de Estudios sobre la Seguridad de los Medicamentos (CESME), antiguo Instituto de Farmacoepidemiología (IFE), de la Universidad de Valladolid.



## IV. Resultados



Durante el periodo de captación de pacientes, de enero de 2004 a junio de 2006, se valoraron 3352 pacientes para su inclusión en el estudio. Se incluyeron finalmente 1634 pacientes; se excluyeron por tanto 1718. El 73,8 % de los pacientes que entraron a formar parte del estudio fueron hombres y el 26,2 % mujeres. Sus edades estaban comprendidas entre los 18 y los 94 años, con una mediana situada en los 64 años de edad. En la tabla 8 se presenta la distribución de los 1634 pacientes por centros hospitalarios y por su condición de caso o control. En total, 474 pacientes fueron identificados como casos (29%) y fueron apareados con 1160 controles (71%).

Tabla 8. Distribución de los casos y los controles según los centros hospitalarios de procedencia

Hospital	Casos	Controles	n (%)
Xeral de Santiago de Compostela	98	289	387 (23,7)
Vall d'Hebron de Barcelona	125	248	373 (22,8)
Clínico Universitario de Valladolid	99	245	344 (21,1)
Galdakao y Basurto	152	378	530 (32,4)
Total	474	1160	1634 (100)

Las características basales de los individuos que entraron a formar parte del estudio se muestran en la tabla 9; se muestra la distribución de la muestra de los casos y los controles por edad, sexo y otras variables pronósticas de interés.

Tabla 9. Distribución de los casos y controles según distintos factores pronósticos

	Número (%)	
	Casos (n=474)	Controles (n=1160)
Edad en años (media; SD)	61,6; 17,0	62,8; 15,6
Sexo, mujer (%)	119 (25,1)	309 (26,6)
IMC (media; SD) <sup>a</sup>	26,5; 4,2	26,9; 4,0
Años de estudio (media; SD) <sup>b</sup>	8,49 (4,5)	7,84 (4,2)
<i>Consumo de tabaco</i>		
No fumador	201 (42,4)	532 (45,9)
Exfumador	157 (32,9)	384 (33,1)
Fumador	117 (24,7)	244 (21,0)
Número de cigarrillos al día(media; SD) <sup>c</sup>	4,2 (10,2)	3,1 (8,5)
Consumo de cafeína	392 (82,7)	961 (82,8)
Consumo de Coca-cola	118 (24,9)	205 (17,7)
<i>Consumo de alcohol</i>		
No consumo	163 (34,4)	407 (35,1)
Consumo bajo	201 (42,2)	550 (47,4)
Consumo moderado	81 (17,1)	176 (15,2)
Consumo alto	29 (6,1)	27 (2,3)
Consumo de algún licor	105 (22,2)	203 (17,5)
Antecedentes familiares de sangrado	119 (25,9)	187 (16,6)
<i>Antecedentes personal más grave</i>		
Ninguno o dispepsia	306 (64,6)	1004 (86,6)
Úlcera de estomago	69 (14,6)	89 (7,7)
Sangrado <sup>d</sup>	99 (20,9)	67 (5,8)
<i>Helicobacter pilory</i> positivo <sup>e</sup>	305 (92,4)	894 (81,5)
<i>Co-morbilidades <sup>f</sup></i>		
Enfermedad de corazón	119 (25,5)	220 (19,1)
Diabetes	73 (15,4)	164 (14,2)
Enfermedad circulatoria	16 (3,4)	34 (2,9)
Migrañas	53 (11,3)	126 (11,0)
Artrosis	129 (29,1)	351 (32,6)
Artritis	25 (5,7)	49 (4,6)

<sup>a</sup> El cálculo del IMC se realizó sobre 474 casos y 1157 controles.

<sup>b</sup> El cálculo de los años de estudio se realizó sobre 473 casos y 1157 controles.

<sup>c</sup> Número de cigarrillos al día sin tener en cuenta a los exfumadores.

<sup>d</sup> Sangrado (heces oscuras, heces con sangre, vómitos oscuros o sanguinolentos).

<sup>e</sup> Se obtuvieron resultados de 330 casos y 1097 controles.

<sup>f</sup> Los cálculos se realizaron sobre 1621 individuos para enfermedad del corazón, 1626 para diabetes, 1629 enfermedad circulatoria, migrañas 1616, artrosis 1521 y artritis 1505.

## Resultados

La distribución de la muestra según los factores genéticos de interés se presenta en la tabla 10.

Tabla 10. Distribución de los casos y controles según los factores pronósticos de carácter genético

	Número (%)	
	Casos (n=474)	Controles (n=1160)
Polimorfismo C50T en COX-1 <sup>a</sup>		
C/C	294 (89,9)	801 (88,8)
C/T	33 (10,1)	97 (10,8)
T/T	0 (0)	4 (0,4)
Polimorfismo A-842G en COX-1 <sup>b</sup>		
A/A	282 (89,8)	767 (90,4)
A/G	32 (10,2)	77 (9,1)
G/G	0	4 (0,5)
Haplotipo C50T/A-842G <sup>c</sup>		
C/C-A/A	307 (89,8)	809 (89,8)
C/T-A/G	35 (10,2)	88 (9,8)
T/T-G/G	0	4 (0,4)
Polimorfismo 4b/4a en eNOS <sup>d</sup>		
b/b y c/b	181 (59,5)	577 (61,8)
b/a	117 (38,5)	333 (35,7)
a/a	6 (2,0)	23 (2,5)

<sup>a</sup> Para el estudio de este polimorfismos se emplearon 327 casos y 902 controles.

<sup>b</sup> Para el estudio de este polimorfismos se emplearon 314 casos y 842 controles.

<sup>c</sup> Para el estudio del haplotipo se emplearon 342 casos y 901 controles.

<sup>d</sup> Para el estudio de este polimorfismos se emplearon 304 casos y 933 controles.

El periodo de tiempo transcurrido desde que comenzaron los síntomas de hemorragia hasta que se produjo el ingreso del paciente fue, por término medio, de 3 días; la mediana fue de 2 días (SD 0,3; IC95%, 2,3 a 3,7). Los casos tomaban por término medio un fármaco más que los controles (casos, 4; controles, 3). Respecto al índice de masa corporal (IMC), se observa que un elevado número de individuos, el 46,4% de la población estudiada, tenía sobrepeso (IMC 25-29,9). El 31,9% de la población presentaba un peso normal (IMC 18,5-24,9), el 3,2% estaba por debajo del peso normal (IMC<18,5) y el 18,5% eran obesos (IMC≥30).

Se obtuvo información del polimorfismo *C50T* del gen *COX-1* de 1229 individuos, lo que supone el 75,2% del total de la muestra inicial (n=1634). De estos, 327 individuos (26,6%) eran casos y 902 (73,4%) controles. De los 1229 individuos con resultado genético del polimorfismo *C50T*, 1095 (89,1%) presentaban el genotipo normal *C/C* y 134 (10,9%) presentaban genotipo polimórfico *C/T* (n=130; 10,6%) o *T/T* (n=4; 0,3%). Las frecuencias genéticas, con la proporción de cada genotipo en la muestra, para los tres genotipos posibles de la variante *C50T* se representan en la tabla 11.

Tabla 11. Distribución de las frecuencias de los genotipos de la variante *C50T* del gen *COX-1* en la muestra estudiada (n=1229)

Genotipo	Casos n (proporción)	Controles n (proporción)	Total n (proporción)
<i>C/C</i>	294 (0,90)	801 (0,89)	1095 (0,89)
<i>C/T</i>	33 (0,10)	97 (0,11)	130 (0,11)
<i>T/T</i>	0	4 (0)	4 (0)

En la tabla 12 se presentan las frecuencias alélicas y las proporciones para los dos posibles alelos de la variante polimórfica.

Tabla 12. Distribución de las frecuencias alélicas de la variante en la posición *C50T* del gen *COX-1* en la muestra estudiada (n=2458)

Alelo	Casos n (proporción)	Controles n (proporción)	Total n (proporción)
C	621 (0,95)	1699 (0,94)	2320 (0,94)
T	33 (0,05)	105 (0,06)	138 (0,06)

Asimismo, se obtuvieron datos genéticos del polimorfismo *A-842G* del gen *COX-1* de 1162 individuos, es decir, del 71,1% del total de la muestra inicial; 314 individuos (27,0%) eran casos y 848 (73,0%) controles. De los 1162 individuos con resultado genético del polimorfismo *A-842G*, 1049 (90,3%) presentaron el genotipo normal *A/A* y 113 (9,7%) presentaban el genotipo polimórfico *A/G* (n=109; 9,4%) o *G/G* (n=4; 0,3%). Para los tres genotipos posibles de la variante *A-842G* se obtuvieron su distribución y las frecuencias genéticas (tabla 13).

Tabla 13. Distribución de las frecuencias de los genotipos de la variante *A-842G* del gen *COX-1* en la muestra estudiada (n=1162)

Genotipo	Casos n (proporción)	Controles n (proporción)	Total n (proporción)
<i>A/A</i>	282 (0,90)	767 (0,90)	1049 (0,90)
<i>A/G</i>	32 (0,10)	77 (0,09)	109 (0,09)
<i>G/G</i>	0	4 (0)	4 (0)

La distribución de los dos posibles alelos de la variante *A-842G* del gen *COX-1* y las frecuencias alélicas en la muestra de estudio que se representan en la tabla 14.

Tabla 14. Distribución de las frecuencias alélicas de la variante en la posición *A-842G* del gen *COX-1* en la muestra estudiada (n=2324)

Alelo	Casos n (proporción)	Controles n (proporción)	Total n (proporción)
A	596 (0,95)	1611 (0,95)	2207 (0,95)
G	32 (0,05)	85 (0,05)	117 (0,05)

La distribución de los dos genotipos de *COX-1* (*C50T* y *A-842G*) en la muestra de estudio fue del 90% para las variantes normales y del 10% de las variantes polimórficas; presentaban la misma distribución en los casos y en los controles. En todos los grupos estudiados, las frecuencias están de acuerdo con lo previsto por el equilibrio de Hardy-Weinberg.

También se obtuvo información sobre el polimorfismo *4b/4a* del gen *eNOS* de 1237 individuos, lo que supone el 75,7% de la muestra inicial; 304 individuos (24,6%) eran casos y 933 individuos (75,4%) eran controles. De los 1237 individuos con resultado del polimorfismo *4b/4a* de *eNOS*, 752 individuos (61,0%) presentaban el genotipo normal *b/b* y 485 individuos (39,2%) presentaban genotipo polimórfico *b/a* (n=450; 36,0 %), *a/a* (n=29; 2,3%) o *b/c* (n=4; 0,5%). La distribución de las frecuencias genéticas y alélicas del polimorfismo *4b/4a* de *eNOS* se presenta en las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Distribución de las frecuencias de los genotipos de las variantes en el intrón 4 del gen *eNOS* en la muestra estudiada (n=1237)

Genotipo	Casos n (proporción)	Controles n (proporción)	Total n (proporción)
<i>b/b</i>	179 (0,59)	573 (0,61)	752 (0,61)
<i>b/a</i>	117 (0,38)	333 (0,36)	450 (0,36)
<i>a/a</i>	6 (0,02)	23 (0,02)	29 (0,02)
<i>b/c</i>	2 (0)	4 (0)	6 (0)

Tabla 16. Distribución de las frecuencias alélicas de las variantes en intrón 4 del gen *eNOS* en la muestra estudiada (n=2474)

Alelo	Casos n (proporción)	Controles n (proporción)	Total n (proporción)
<i>b</i>	477 (0,78)	1483 (0,79)	1960 (0,79)
<i>a</i>	129 (0,21)	379 (0,20)	508 (0,21)
<i>c</i>	2 (0)	4 (0)	6 (0)

La distribución de los genotipos de *eNOS* para el polimorfismo *4b/4a* en la muestra de estudio fue del 61% para las variables normales y del 39% de las variables polimórficas, igual distribuidas en la población de casos y en la de controles. En todos los grupos estudiados, las frecuencias están de acuerdo con lo previsto por el equilibrio de Hardy-Weinberg.

### Equilibrio de Hardy-Weinberg

Las frecuencias alélicas esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg para los alelos estudiados se recogen en la tabla 17. La proporción en la muestra para el alelo *b* de *eNOS* es de 0,80; 0,94 para el alelo *C* de *COX-1* y 0,95 para el alelo *A* de *COX-1*.

Tabla 17. Frecuencias alélicas (proporciones) esperadas según equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de estudio

Polimorfismo	Alelo Mayor	Proporciones del alelo mayor	Equilibrio de Hardy-Weinberg
<i>C50T</i>	<i>C</i>	0,94	0,790579
<i>A842G</i>	<i>A</i>	0,95	0,529719
<i>4b/4a</i>	<i>b</i>	0,80	0,000037

## Factores de riesgo asociados con la hemorragia gastrointestinal

Se estimaron las OR crudas de los factores genéticos de interés, con sus intervalos de confianza al 95%; del mismo modo se estimaron los riesgos ajustados mediante un modelo de regresión logística condicional multivariante. Los resultados de este análisis se presentan en la tabla 18.

Tabla 18. Riesgo de HGI asociado a la presencia de los distintos polimorfismos

Genotipos	casos	controles	OR cruda (IC95%)	OR ajustada (IC95%)*
<i>C50T</i>				
<i>C/C</i>	294	801	1,0 (ref)	1,0 (ref)
<i>C/T</i>	33	97	0,93 (0,61-1,41)	
<i>T/T</i>	0	4	0,00 (0,00- Inf)	
<i>C/T o T/T</i>	33	101	0,89 (0,59-1,35)	0,69 (0,39-1,22)
<i>A-842G</i>				
<i>A/A</i>	282	767	1,0 (ref)	1,0 (ref)
<i>A/G</i>	32	77	1,13 (0,73-1,75)	
<i>G/G</i>	0	4	0,00(0,00- Inf)	
<i>A/G o G/G</i>	32	81	1,08 (0,70-1,65)	0,77 (0,41-1,45)
<i>C50T/A-842G</i>				
<i>C/C-A/A</i>	809	307	1,0 (ref)	1,0 (ref)
<i>C/T- A/G</i>	88	35	1,05 (0,69-1,58)	
<i>T/T-G/G</i>	4	0	0,00 (0,00- Inf)	
<i>C/T-A/G o T/T-G/G</i>	92	35	1,00 (0,67-1,51)	0,75 (0,39-1,44)
<i>4b/4a</i>				
<i>b/b y b/c</i>	181	577	1,0 (ref)	1,0 (ref)
<i>b/a</i>	117	333	0,83 (0,33-2,07)	
<i>a/a</i>	6	23	1,12 (0,86-1,47)	
<i>b/a o a/a</i>	123	356	1,10 (0,85-1,44)	1,21 (0,80-1,82)

OR ajustada por los antecedentes del paciente, el consumo de alcohol y la exposición a AINE (grupo M01) y salicilatos, antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes orales, antiácidos, inhibidores de la bomba de protones y antagonistas H<sub>2</sub>.

### Interacción entre la exposición a AINE y las distintas variantes genéticas consideradas

Se analizaron aparte los genotipos del grupo de pacientes expuestos a AINE para ver si la presencia de algún genotipo polimórfico se asociaba con un mayor riesgo de hemorragias gastrointestinales. Para este estudio, se agruparon los AINE del grupo M01A (analgésicos, antiinflamatorios) y los salicilatos. El valor de los riesgos de hemorragia gastrointestinal asociados a la presencia de las distintas variantes polimórficas de cada gen estudiado en los pacientes expuestos a AINE, se recoge en la tabla 19.

Tabla 19. Riesgo de HGI asociado a los polimorfismos (A-842G, C50T y 4b/4a de eNOS) en pacientes expuestos a AINE

Genotipo	Nº Expuestos a AINE	Nº Casos hemorragia	Expuestos a AINE	
			OR cruda (IC95%)	OR ajustada (IC95%)
<i>C50T</i>				
<i>C/C</i>	298	130	Ref.	Ref.
<i>C/T o T/T</i>	41	21	1,36 (0,71-2,61)	1,13 (0,24-5,30)
<i>A-842G</i>				
<i>A/A</i>	290	129	Ref.	Ref.
<i>A/G o G/G</i>	36	19	1,39 (0,70-2,79)	0,84 (0,15-4,84)
<i>C50T/A-842G</i>				
<i>C/C - A/A</i>	282	123	Ref.	Ref.
<i>C/T - T/T o A/G - G/G</i>	34	17	1,29 (0,63-2,64)	0,82 (0,14-4,68)
<i>4b/4a</i>				
<i>b/b o b/c</i>	204	84	Ref.	Ref.
<i>b/a o a/a</i>	131	58	1,14 (0,73-1,77)	1,56 (0,48-5,09)

## Resultados

La asociación entre la hemorragia gastrointestinal y la presencia de la variante polimórfica de cada gen en los pacientes no expuestos a AINE se recoge en la tabla 20.

Tabla 20. Riesgo de HGI ALTA asociado a los polimorfismos (A-842G, C50T e intrón 4 a/b VNTR de eNOS) en pacientes no expuestos a AINE, expresado como OR crudas (IC95%)

Genotipo	Nº No expuestos a AINE	Nº Casos hemorragia	NO Expuestos a AINE	
			OR cruda (IC95%)	OR ajustada (IC95%)
<i>C50T</i>				
<i>C/C</i>	797	164	Ref.	Ref.
<i>C/T o T/T</i>	93	12	0,57 (0,30-1,07)	0,74 (0,30-1,84)
<i>A-842G</i>				
<i>A/A</i>	759	153	Ref.	Ref.
<i>A/G o G/G</i>	77	13	0,80 (0,43-1,50)	1,02 (0,40-2,60)
<i>C50T/A-842G</i>				
<i>C/C - A/A</i>	734	145	Ref.	Ref.
<i>C/T - T/T o A/G - G/G</i>	74	12	0,79 (0,41-1,50)	1,05 (0,40-2,72)
<i>4b/4a</i>				
<i>b/b o b/c</i>	554	145	Ref.	Ref.
<i>b/a o a/a</i>	348	65	1,08 (0,76-1,53)	1,64 (0,81-3,34)

## V. Discusión



De todas las variantes genéticas que se han relacionado con el riesgo de hemorragia digestiva, en el presente estudio se han valorado dos correspondientes al gen *COX-1* (*C50T* -región codificante- y *A-842G* -región promotora-), y una correspondiente al gen *eNOS* (*4b/4a*). Estos genes regulan la producción de enzimas implicadas en la síntesis de prostaglandinas, y en la síntesis de óxido nítrico (NO); en definitiva, se trata de genes relacionados con la producción de sustancias protectoras de la mucosa gástrica (PG y NO). Las variantes de *COX-1* se han asociado con un déficit de la función de la enzima; por el contrario, las variantes de *eNOS* se han asociado con un aumento de la función de la enzima y el consiguiente aumento de la síntesis de NO.

En cuanto a la distribución de variantes de *COX-1* consideradas (*C50T* y *A-842G*), alrededor del 10% de los individuos de nuestra muestra tenía alguno de estos polimorfismos; esta distribución fue similar para casos y controles. Este porcentaje coincide con el encontrado por van Oijen y cols (2006) en una población caucásica de Holanda (n=194). También coincide con el encontrado por Hillarp y cols. (2003), para la variante *C50T*, en una muestra caucásica en Suecia (n=279). En relación a las variantes en el gen *eNOS*, el 40% de nuestra muestra presentaba cuatro o seis repeticiones del fragmento de 27 pb, en vez de las cinco repeticiones que presenta el alelo más frecuente; el 38% de los individuos estudiados eran heterocigotos *4a/4b* y presentaban en una copia del gen un fragmento de cuatro repeticiones de 27 pb (alelo *a*) y en la otra copia del gen un fragmento de cinco repeticiones (alelo *b*); el 2% presentaba 2 fragmentos de cuatro repeticiones en cada copia del gen siendo homocigotos mutados *4a/4a*. El

porcentaje de heterocigotos es ligeramente superior al 28% observado por Piazzuelo y cols. (2008) en una muestra de población española (n=354). Además, hemos encontrado un nuevo alelo formado por seis repeticiones en tándem del fragmento de 27 pb, el alelo *c*, no descrito antes en población española. Este alelo sí había sido descrito previamente por Bolli y cols. (2007) en una población italiana.

De acuerdo a la hipótesis de partida del presente estudio, las variantes polimórficas en el gen de la COX-1 se asociarían con una disminución o ausencia de prostaglandinas protectoras y, las variantes del gen de la eNOS, con un aumento de NO, considerada esta, también, como sustancia protectora de la mucosa gástrica. En la muestra estudiada, las variantes genéticas en el gen *COX-1* (*C50T* y *A-842G*) no se asociaron con un mayor riesgo de HGI alta [*C50T*, OR=0,7 (IC95%=0,4-1,2); *A-842G*, OR=0,8 (IC95%=0,4-1,5)]; tampoco las variantes en el gen *eNOS* se asociaron con una disminución del riesgo de HGI alta [*b/a* o *a/a*, OR=1,2 (IC95%=0,8-1,8)]. Cuando analizamos la interacción de las variantes polimórficas estudiadas con los AINE, se encontró un estimador central compatible con una ligera asociación de las variantes de *eNOS*, tomadas de forma conjunta (*a/b* o *a/a*), con un mayor riesgo de HGI alta; aunque esto se observó tanto en el subgrupo de pacientes expuestos a AINE (OR ajustada, 1,6, IC95%, 0,5-5,1; n=335) como en el de los no expuestos (OR ajustada, 1,6, IC95%, 0,8-3,3; n=902), estos valores no fueron estadísticamente significativos y, en cualquier caso, no diferían entre sí, por lo que no parece existir ninguna interacción.

El apareamiento de los casos y de los controles por edad y sexo dio como resultado unos grupos comparables a este respecto (véase Tabla 9); sin embargo, otros factores de riesgo para la HGI como los antecedentes de sangrado o la presencia de *Helicobacter pylori* fueron más prevalentes en los casos que en los controles. Creemos que el ajuste estadístico posterior llevado a cabo a través del análisis de regresión logística fue capaz de evitar la influencia que pudieran tener esas variables; el ajuste efectuado incluyó además la exposición a antiagregantes plaquetarios (sin incluir aspirina), los antecedentes de sangrado, la exposición a antiácidos, el consumo de

alcohol, la exposición a anticoagulantes orales y la exposición a protectores gástricos (inhibidores de la bomba de protones y antihistamínicos H<sub>2</sub>).

La ausencia de asociación entre los polimorfismos de *COX-1* estudiados (*C50T* y *A-842G*) y la HGI alta que se ha encontrado en el presente estudio coincide con lo observado por van Oijen y cols. (2006). Estos autores, en un estudio de casos (n=106) y controles (n=88), encontraron de igual forma una OR ajustada, no significativa, de 0,75, para el haplotipo *A-842G/C50T* (IC95%, 0,19-3,01); la OR cruda fue de 0,5 (IC95%, 0,18-1,34). En nuestro caso los valores de las OR de los dos polimorfismos estudiados disminuyeron al ajustar, pasaron de 0,9 y 1,1 respectivamente a 0,7 y 0,8, respectivamente (Tabla 18). Para el haplotipo, el valor del riesgo de 0,75 encontrado en nuestro estudio fue exactamente el mismo que el encontrado por van Oijen y cols. (2006).

Si bien nuestro análisis se centró en los factores de riesgo genéticos, otros factores asociados a la hemorragia gastrointestinal también fueron considerados en el estudio. En la tabla E de los anexos, se presentan los valores de distintas variables estimados en uno de los modelos multivariantes utilizados. Resulta de interés señalar que los valores que se han estimado en este estudio para otras variables son coherentes con los datos de la literatura. Así por ejemplo, el riesgo asociado con la exposición a AINE en el modelo construido para el estudio de polimorfismo *C50T* [OR ajustada, 5,30 (IC95%, 3,58-7,85)] es coincidente con los elevados riesgos de sangrado asociados a este factor en los distintos estudios (Ofman y cols., 2002). Puesto que el número de muestras disponibles fue distinto para el análisis de cada uno de los polimorfismos considerados, se construyeron varios modelos; los valores de los riesgos de los distintos factores ambientales a partir de estos modelos fueron de igual modo coherentes con los datos de la literatura (Tablas E, F, G Y H de los anexos). Esta coherencia señalada refuerza en cierta medida la confianza en nuestro estudio y en los resultados obtenidos.

Entre las fortalezas de nuestro estudio está la amplitud de la muestra, muy superior a los estudios anteriores sobre estos mismos factores de riesgo, y el detallado cuestionario llevado a cabo; este cuestionario recogía

abundante información que facilitó un mejor ajuste en el análisis. Por otra parte, la selección de los controles entre pacientes del mismo hospital, con características muy similares a los casos, fue muy rigurosa; cabe señalar, que todos los monitores fueron entrenados para procurar la mayor uniformidad en la recogida de la información. En particular, la recogida de la información sobre la exposición a fármacos se realizó mediante procedimientos que evitaran los sesgos, se dispuso a estos efectos de un catálogo ilustrado de los medicamentos de interés para mostrar a los pacientes. Si bien la muestra de pacientes fue en comparación elevada, la baja prevalencia de ciertas variantes genéticas hace perder poder estadístico a nuestra muestra; esto indudablemente es una de las debilidades en este tipo de estudios.

Es de interés señalar, para la interpretación de los resultados obtenidos en relación con las variantes del gen *COX-1*, que la falta de la enzima *COX-1* en ratones no se asoció curiosamente con patología gástrica cuando se administró indometacina (Langenbach y cols., 1995); aunque hubo una reducción de un 99% en los niveles de  $PGE_2$ , ninguno de los ratones estudiados desarrollo lesiones gástricas. Se ha postulado a este respecto, y esto sería congruente con nuestros resultados, que la inhibición de la *COX-1* podría compensarse con la acción productora de prostaglandinas de la *COX-2* (Langenbach y cols., 1995; Dinchuk y cols., 1995). Esto, sin descartar el papel compensador ya mencionado que podría ejercer el óxido nítrico.

En relación con las variantes del gen que codifica para la *eNOS*, para las que no hemos encontrado ninguna asociación con la hemorragia gastrointestinal, cabría mencionar los resultados poco consistentes de distintos estudios que han correlacionado las variantes alélicas de *eNOS* con los niveles plasmáticos de NO (nitritos y nitratos); en un estudio se asoció el carácter portador del alelo *a* con un aumento de metabolitos de NO en plasma (Wang y cols., 1997); en otro una disminución (Song y cols., 2003) y en un tercer estudio con una muestra de 1221 individuos no se encontró asociación (Jeerooburkhan y cols., 2001). Nuestro estudio con una muestra mayor que la de los otros estudios sería congruente con este último estudio.

### **El estudio Emplogen en el contexto de la farmacogenética actual**

El estudio que se presenta sobre las variantes genéticas polimórficas de los genes que codifican para las enzimas COX-1 y eNOS se enmarca en una iniciativa más amplia, en estos últimos años, de estudio de otras variantes asociadas con distintas reacciones adversas (Tabla 21). Este sería el caso, sin duda el más notable, de la variante *HLA-B\*5701* del complejo de histocompatibilidad asociada a reacciones graves de hipersensibilidad por abacavir; esta reacción afecta a distintos órganos y cursa con fiebre, eritema, afectación gastrointestinal o síntomas respiratorios. En el estudio en que se dio a conocer la importancia de esta asociación (Mallal y cols., 2008), las reacciones clínicas de hipersensibilidad aparecieron en un 7,8% (66/847) de los tratados de forma convencional, mientras que en el grupo de tratados después de someterse a un test genético para la variante alélica *HLA-B\*5701* y descartar a los que dieran positivo, apareció en un 3,4% (27/803). Se estimó en este mismo estudio que el 61% de los infectados por el virus del sida que dieran positivo en un test para *HLA-B\*5701* desarrollarían una reacción grave de hipersensibilidad comparado con sólo un 4,5% en los pacientes que dieran negativo; de esta manera la realización del test previo al tratamiento reduciría la aparición del cuadro clínico de hipersensibilidad en un 60% en comparación con la aplicación estándar del tratamiento. Otros estudios han corroborado estos resultados en relación con el abacavir (Hughes y cols., 2008; Saag y cols., 2008).

Tabla 21. Variantes genéticas asociadas con distintas reacciones adversas

Fármaco	Variante genética	Reacción
Azatioprina y 6-mercaptopurina	TPMT	Mielodepresión
Irinotecan	UGT1A1*28	Neutropenia
Anticoagulantes orales	CYP2C9*3 VKORC1	Hemorragias

---

Antidepresivos tricíclicos	CYP2D6	Toxicidad inespecífica
Abacavir	HLA-B*5701	Reacciones graves de hipersensibilidad
Carbamazepina	HLA-B*1502	Síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica
Melagatran y ximelagatran <sup>a</sup>	HLA-DRB1*07 y DQA1*02	Hepatotoxicidad
Simvastatina	SLCO1B1	Miopatías

---

<sup>a</sup>Exanta<sup>®</sup>, retirado en febrero de 2006 por la compañía AstraZeneca debido a su toxicidad hepática.

Cabría señalar que en lo concerniente a la predicción de la eficacia de los tratamientos, también se han producido algunos hitos destacados como la identificación de variantes en el gen *IL28B*, que codifica para el interferón- $\lambda$ -3 (IFN- $\lambda$ -3); las variantes en este gen predicen la respuesta al tratamiento en los pacientes afectados de hepatitis C (Ge y cols., 2009); en la actualidad, varias fármacos antitumorales de carácter biológico necesitan de test genéticos para su utilización.

El proyecto Emphogen —del que forma parte el presente estudio— es una colaboración internacional de distintos grupos de investigación cuyo objetivo es la identificación y el análisis de distintos factores de riesgo de la hemorragia gastrointestinal. Hasta la fecha ha analizado distintos riesgos ambientales (Carvajal y cols., 2011; Ubeira y cols., 2011) y genéticos (Figueiras y cols., 2013, en prensa). Dentro de los factores genéticos se han analizado los factores asociados con el metabolismo de los AINE, los agentes causantes de una buena proporción de las hemorragias gastrointestinales que se dan en los pacientes tratados con esta medicación. Por otra parte, también se han analizado, y es el motivo del presente trabajo, las variantes en los genes que codifican para las enzimas que intervienen en la síntesis de los factores protectores de la mucosa gástrica. Es decir, se han analizado factores relacionados con factores externos (los AINE) y con el medio interno (prostaglandinas y NO). Mientras que, para las

variantes en genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de los AINE, se ha encontrado una asociación (Tabla 22), para las involucradas en la síntesis de los factores protectores de la mucosa gástrica no se ha encontrado asociación con el sangrado gastrointestinal. Es probable que las vías metabólicas de los AINE admitan pocas alternativas; sin embargo, los factores protectores podrían suplirse en cierta medida. De esta manera, si se diera una disminución de la síntesis de prostaglandinas podría suplirse con una mayor síntesis de NO. En efecto, se ha identificado una vía común que relaciona las dos sustancias; al parecer, la bombesina, un péptido de 14 aminoácidos, es capaz de estimular la liberación de gastrina y colecistoquinina, ambas sustancias tienen acción protectora de la mucosa gástrica (West y cols., 2005). La acción protectora se ejercería en última instancia por las prostaglandinas y el óxido nítrico. Todo ello estaría regulado por la bombesina; el efecto protector observado con bombesina desaparecería al bloquear la síntesis de ácido nítrico (Castaneda y cols., 2000).

Tabla 22. Factores de riesgo genético de la HGI alta asociada a AINE. Estimaciones del estudio Emphogen

Genotipo CYP2C9	OR (IC 95%)	Comentarios
*1/*3, *3/*3	18,9 (5,8-61,6)	En pacientes con AINEmC9 y con dosis altas
*1/*3	4,7 (2,4-9,2)	En pacientes expuestos a AINE
*1/*3	14,7 (1,6-134,0)	En pacientes expuestos a AINE y acenocumarol

En resumen, no se ha encontrado asociación entre los polimorfismos estudiados y la hemorragia gastrointestinal. La complejidad de los

mecanismos involucrados en la protección de la mucosa gástrica —mayor que la sospechada— hace pensar que en el caso en que una función se altere, otros mecanismos alternantes de carácter compensatorio entren en juego.

## VI. Conclusiones



### **Primera**

La frecuencia de las variantes polimórficas de *COX-1* (*C50T* y *A-842G*) fue de un 10% en la muestra estudiada perteneciente a población española caucásica.

### **Segunda**

La frecuencia de las variantes de *eNOS* (*b/a* o *a/a*) fue de un 38%. Se identificó, de manera marginal, una variante que incluía el alelo mutado *c*.

### **Tercera**

Las variantes polimórficas de *COX-1* (*C50T* y *A-842G*) no se asociaron con un mayor riesgo hemorragia gastrointestinal.

### **Cuarta**

Las variantes de *eNOS* (*b/a* o *a/a*) no se asociaron con una mayor protección frente a hemorragia gastrointestinal.



## Bibliografía



AEMPS. Ficha técnica del Sintrom®.

AEMPS. Nota Informativa 2003/06, "Nota Informativa De La Agencia Española Del Medicamento Sobre El Síndrome De Reye. USO PEDIÁTRICO DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO/SALICILATOS Y SÍNDROME DE REYE (Recomendaciones Del Comité De Seguridad De Medicamentos De Uso Humano)" (2003), [http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2003/NI\\_2003-06\\_AAS-Sindrome-Reye.htm](http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2003/NI_2003-06_AAS-Sindrome-Reye.htm) (accessed Última actualización: 14/05/2003).

AEMPS. Nota Informativa MUH (FV), 15/2012. Seguridad cardiovascular de los AINE tradicionales: Conclusiones de la revisión de los últimos estudios publicados.

Agundez, J. A., E. Garcia-Martin, and C. Martinez. 2009. Genetically based impairment in CYP2C8- and CYP2C9-dependent NSAID metabolism as a risk factor for gastrointestinal bleeding: Is a combination of pharmacogenomics and metabolomics required to improve personalized medicine? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 5 (6) (Jun): 607-20.

- Alvarez-Ibanez, C., and M. M. Guerra-Garcia. 2012. Evaluation of the incidence of upper gastrointestinal bleeding in Spain in relation to the taking of anti-ulcer agents. *Atencion Primaria / Sociedad Espanola De Medicina De Familia y Comunitaria* 44 (8) (Aug): 478-84.
- Alvarez-Sabin, J., G. Calvo, and R. Morros. 1997. Secondary prevention of ischemic strokes: Effect of dosage of aspirin]. *Revista De Neurologia* 25 (140) (Apr): 541-4.
- Arisawa, T., and I. Hirata. 2007. Genetic polymorphism of COX-1 gene and NSAID-induced ulcer. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine* 65 (10) (Oct): 1885-9.
- Arisawa, T., T. Tahara, T. Shibata, M. Nagasaka, M. Nakamura, Y. Kamiya, H. Fujita, et al. 2007. Association between genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-1 gene promoter and peptic ulcers in Japan. *International Journal of Molecular Medicine* 20 (3) (Sep): 373-8.
- Arisawa, T., T. Tahara, T. Shibata, M. Nagasaka, M. Nakamura, Y. Kamiya, H. Fujita, et al. 2008. Genetic polymorphisms of cyclooxygenase-1 (COX-1) are associated with functional dyspepsia in Japanese women. *Journal of Women's Health* (2002) 17 (6) (Jul-Aug): 1039-43.
- Arisawa, T., T. Tahara, T. Shibata, M. Nagasaka, M. Nakamura, Y. Kamiya, H. Fujita, et al. 2008. Promoter polymorphism of cyclooxygenase-1 (COX1) is not associated with ulcerative colitis in the Japanese population. *Hepato-Gastroenterology* 55 (84) (May-Jun): 987-90.
- Battistella, M., M. M. Mamdami, D. N. Juurlink, L. Rabeneck, and A. Laupacis. 2005. Risk of upper gastrointestinal hemorrhage in warfarin users treated with nonselective NSAIDs or COX-2 inhibitors. *Archives of Internal Medicine* 165 (2) (Jan 24): 189-92.
- Blanco, G., C. Martinez, J. M. Ladero, E. Garcia-Martin, C. Taxonera, F. G. Gamito, M. Diaz-Rubio, and J. A. Agundez. 2008. Interaction of CYP2C8 and CYP2C9 genotypes modifies the risk for nonsteroidal anti-inflammatory drugs-related acute gastrointestinal bleeding. *Pharmacogenetics and Genomics* 18 (1) (Jan): 37-43.
- Blatchford, O., L. A. Davidson, W. R. Murray, M. Blatchford, and J. Pell. 1997. Acute upper gastrointestinal haemorrhage in West of Scotland: Case ascertainment study. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 315 (7107) (Aug 30): 510-4.
- Bode, C., and J. C. Bode. 2003. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 17 (4) (Aug): 575-92.
- Bolli, P., E. Sticchi, R. Abbate, and C. Fatini. 2007. A novel allele of eNOS gene in the Italian population: The actual essence of intron 4 polymorphism.

---

*Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society* 16 (3) (May): 392-4.

Calvo, LM, and RM Apolinario. 2004. Síndromes paraneoplásicos. *Biocancer. ISSN 1697-6452* 1 .

Carbonell, N., C. Verstuyft, J. Massard, A. Letierce, C. Cellier, L. Deforges, F. Saliba, J. C. Delchier, and L. Becquemont. 2010. CYP2C9\*3 loss-of-function allele is associated with acute upper gastrointestinal bleeding related to the use of NSAIDs other than aspirin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 87 (6) (Jun): 693-8.

Carvajal, A., S. Ortega, L. Del Olmo, X. Vidal, C. Aguirre, B. Ruiz, A. Conforti, et al. 2011. Selective serotonin reuptake inhibitors and gastrointestinal bleeding: A case-control study. *PLoS One* 6 (5): e19819.

Castaneda, A.A., Kim, Y.S., Chang, L.K., Cui, Y. & Mercer, D.W. 2000, Nitric oxide synthase inhibition negates bombesin-induced gastroprotection, *Surgery*, vol. 128, no. 3, pp. 422-428.

Castellsague, J., N. Riera-Guardia, B. Calingaert, C. Varas-Lorenzo, A. Fourier-Reglat, F. Nicotra, M. Sturkenboom, S. Perez-Gutthann, and Safety of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (SOS) Project. 2012. Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications: A systematic review and meta-analysis of observational studies (the SOS project). *Drug Safety : An International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience* 35 (12) (Dec 1): 1127-46.

Chan, F. K., S. C. Chung, B. Y. Suen, Y. T. Lee, W. K. Leung, V. K. Leung, J. C. Wu, et al. 2001. Preventing recurrent upper gastrointestinal bleeding in patients with helicobacter pylori infection who are taking low-dose aspirin or naproxen. *The New England Journal of Medicine* 344 (13) (Mar 29): 967-73.

Chiu, P. W., and J. J. Sung. 2010. Acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Current Opinion in Gastroenterology* 26 (5) (Sep): 425-8.

Cohen, M., B. Sapoznikov, and Y. Niv. 2007. Primary and secondary nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Journal of Clinical Gastroenterology* 41 (9) (Oct): 810-3.

Coloma, P. M., M. J. Schuemie, G. Trifiro, R. Gini, R. Herings, J. Hippisley-Cox, G. Mazzaglia, et al. 2011. Combining electronic healthcare databases in europe to allow for large-scale drug safety monitoring: The EU-ADR project. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 20 (1) (Jan): 1-11.

Costa, J. 2004. Real-time PCR. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clinica* 22 (5) (May): 299,304; quiz 305.

- Dall, M., O. B. Schaffalitzky de Muckadell, A. T. Lassen, J. M. Hansen, and J. Hallas. 2009. An association between selective serotonin reuptake inhibitor use and serious upper gastrointestinal bleeding. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 7 (12) (Dec): 1314-21.
- Dall, M., O. B. Schaffalitzky de Muckadell, J. Moller Hansen, M. Wildner-Christensen, A. Touborg Lassen, and J. Hallas. 2011. Helicobacter pylori and risk of upper gastrointestinal bleeding among users of selective serotonin reuptake inhibitors. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* (May 10).
- Davies, N. M., R. L. Good, K. A. Roupe, and J. A. Yanez. 2004. Cyclooxygenase-3: Axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--not as easy as 1, 2, 3. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques* 7 (2) (Jul 9): 217-26.
- Davies, N. M., and J. L. Wallace. 1997. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal toxicity: New insights into an old problem. *Journal of Gastroenterology* 32 (1) (Feb): 127-33.
- De Abajo, F. J. 2011. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet function: Mechanisms, clinical outcomes and implications for use in elderly patients. *Drugs & Aging* 28 (5) (May 1): 345-67.
- De Abajo, F. J., J. G. del Pozo, and A. del Pino. 2005. Trends of non-steroidal anti-inflammatory drugs use in Spain, 1990 through 2003. *Atencion Primaria / Sociedad Espanola De Medicina De Familia y Comunitaria* 36 (8) (Nov): 424-33.
- De Abajo, F. J., L. A. Rodriguez, and D. Montero. 1999. Association between selective serotonin reuptake inhibitors and upper gastrointestinal bleeding: Population based case-control study. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 319 (7217) (Oct 23): 1106-9.
- Desai, J. C., T. Goo, M. Fukata, S. Sanyal, A. Dikman, K. Miller, L. Cohen, et al. 2009. NSAID-induced antral ulcers are associated with distinct changes in mucosal gene expression. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 30 (1) (Jul): 71-81.
- Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J. & Czerniak, P.M. 1995. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*, vol. 378, no. 6555, pp. 406-409.
- Ferrer, R., and J. J. Moreno. 2010. Role of eicosanoids on intestinal epithelial homeostasis. *Biochemical Pharmacology* 80 (4) (Aug 15): 431-8.

- Figueiras, A., A. Estany-Gestal, C. Aguirre, B. Ruiz, X. Vidal, A. Carvajal, I. Salado, et al. Variantes del CYP2C9 y riesgo de HGI asociado al consumo de AINE: Un estudio de casos y controles. (*En Prensa 2013*).
- Fosslien, E. 2005. Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 35 (4) (Autumn): 347-85.
- García del Pozo, J., and FJ De Abajo. *Utilización De Antiinflamatorios no Esteroides (AINE) En España, 1992-2006. División De Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia De La Agencia Española De Medicamentos y Productos Sanitarios.*
- Garcia Rodriguez, L. A., A. Gonzalez-Perez, H. Bueno, and J. Hwa. 2011. NSAID use selectively increases the risk of non-fatal myocardial infarction: A systematic review of randomised trials and observational studies. *PloS One* 6 (2) (Feb 8): e16780.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchison, J.G. & Goldstein, D.B. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, vol. 461, no. 7262, pp. 399-401.
- Halushka, M. K., L. P. Walker, and P. V. Halushka. 2003. Genetic variation in cyclooxygenase 1: Effects on response to aspirin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 73 (1) (Jan): 122-30.
- Harirforoosh, S., and F. Jamali. 2009. Renal adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Expert Opinion on Drug Safety* 8 (6) (Nov): 669-81.
- Hillarp, A., B. Palmqvist, S. Lethagen, B. O. Villoutreix, and I. Mattiasson. 2003. Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin non-responders with recurrence of stroke. *Thrombosis Research* 112 (5-6): 275-83.
- Huang, J. Q., S. Sridhar, and R. H. Hunt. 2002. Role of helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: A meta-analysis. *Lancet* 359 (9300) (Jan 5): 14-22.
- Hughes, C.A., Foisy, M.M., Dewhurst, N., Higgins, N., Robinson, L., Kelly, D.V. & Lechelt, K.E. 2008. Abacavir hypersensitivity reaction: an update. *The Annals of Pharmacotherapy*, vol. 42, no. 3, pp. 387-396.
- IMS Institute for Healthcare Informatics. The use of medicines in the united states: Review of 2011 . 2011 [cited 17 febrero 2012]. Available from <http://mobile.pharmacytimes.com/publications/issue/2012/July2012/Top-200-Drugs-of-2011#sthash.71toePx6.dpuf>.

- Jeerooburkhan, N., Jones, L.C., Bujac, S., Cooper, J.A., Miller, G.J., Vallance, P., Humphries, S.E. & Hingorani, A.D. 2001. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*, vol. 38, no. 5, pp. 1054-1061.
- Kim, I. J., J. Bae, S. W. Lim, D. H. Cha, H. J. Cho, S. Kim, D. H. Yang, S. G. Hwang, D. Oh, and N. K. Kim. 2007. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in korean patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research* 119 (5): 579-85.
- Laharie, D., C. Droz-Perroteau, J. Benichou, M. Amouretti, P. Blin, B. Begaud, E. Guiard, et al. 2010. Hospitalizations for gastrointestinal and cardiovascular events in the CADEUS cohort of traditional or coxib NSAID users. *British Journal of Clinical Pharmacology* 69 (3) (Mar): 295-302.
- Laine, L., E. S. Maller, C. Yu, H. Quan, and T. Simon. 2004. Ulcer formation with low-dose enteric-coated aspirin and the effect of COX-2 selective inhibition: A double-blind trial. *Gastroenterology* 127 (2) (Aug): 395-402.
- Laine, L., H. Yang, S. C. Chang, and C. Datto. 2012. Trends for incidence of hospitalization and death due to GI complications in the united states from 2001 to 2009. *The American Journal of Gastroenterology* 107 (8) (Aug): 1190,5; quiz 1196.
- Lanas, A. 2008. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Research & Therapy* 10 Suppl 2 : S4.
- Lanas, A., E. Bajador, P. Serrano, J. Fuentes, S. Carreno, J. Guardia, M. Sanz, M. Montoro, and R. Sainz. 2000. Nitrovasodilators, low-dose aspirin, other nonsteroidal antiinflammatory drugs, and the risk of upper gastrointestinal bleeding. *The New England Journal of Medicine* 343 (12) (Sep 21): 834-9.
- Lanas, A., M. A. Perez-Aisa, F. Feu, J. Ponce, E. Saperas, S. Santolaria, L. Rodrigo, et al. 2005. A nationwide study of mortality associated with hospital admission due to severe gastrointestinal events and those associated with nonsteroidal antiinflammatory drug use. *The American Journal of Gastroenterology* 100 (8) (Aug): 1685-93.
- Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., Kim, H.S. & Smithies, O. 1995. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*, vol. 83, no. 3, pp. 483-492.
- Laporte, J. R., L. Ibanez, X. Vidal, L. Vendrell, and R. Leone. 2004. Upper gastrointestinal bleeding associated with the use of NSAIDs: Newer versus older agents. *Drug Safety : An International Journal of Medical*

---

*Toxicology and Drug Experience* 27 (6): 411-20.

- Laporte, J. R., X. Vidal, and X. Carne. 1995. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in elderly people. gastrointestinal bleeding is common. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 311 (7001) (Aug 5): 391-2.
- Laporte, J-R, X. Carné, X. Vidal, V. Moreno, and J. Juan. 1991. Upper gastrointestinal bleeding in relation to previous use of analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Lancet* 337 (8733) (1/12): 85-9.
- Lee, C. R., F. G. Bottone Jr, J. M. Krahn, L. Li, H. W. Mohrenweiser, M. E. Cook, R. M. Petrovich, D. A. Bell, T. E. Eling, and D. C. Zeldin. 2007. Identification and functional characterization of polymorphisms in human cyclooxygenase-1 (PTGS1). *Pharmacogenetics and Genomics* 17 (2) (Feb): 145-60.
- Lembke, A., K. A. Bradley, P. Henderson, R. Moos, and A. H. Harris. 2011. Alcohol screening scores and the risk of new-onset gastrointestinal illness or related hospitalization. *Journal of General Internal Medicine* 26 (7) (Jul): 777-82.
- Li, H., and T. L. Poulos. 2005. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (1) (Jan): 293-305.
- Lipsky, P. E., P. Brooks, L. J. Crofford, R. DuBois, D. Graham, L. S. Simon, L. B. van de Putte, and S. B. Abramson. 2000. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Archives of Internal Medicine* 160 (7) (Apr 10): 913-20.
- Loke, Y. K., A. N. Trivedi, and S. Singh. 2008. Meta-analysis: Gastrointestinal bleeding due to interaction between selective serotonin uptake inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 27 (1) (Jan 1): 31-40.
- Longstreth, G. F. 1995. Epidemiology of hospitalization for acute upper gastrointestinal hemorrhage: A population-based study. *The American Journal of Gastroenterology* 90 (2) (Feb): 206-10.
- Loperfido, S. 1995. Incidence of gastrointestinal bleeding in Italy is similar to that in Britain. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 311 (7009) (Sep 30): 874.
- Mallal, S., Phillips, E., Carosi, G., Molina, J.M., Workman, C., Tomazic, J., Jagel-Guedes, E., Rugina, S., Kozyrev, O., Cid, J.F., Hay, P., Nolan, D., Hughes, S., Hughes, A., Ryan, S., Fitch, N., Thorborn, D., Benbow, A. & PREDICT-1 Study Team 2008. HLA-B\*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *The New England journal of medicine*, vol. 358, no. 6, pp. 568-579.

- Martinez, C., G. Blanco, E. Garcia-Martin, and JAG Agúndez. 2006. Farmacogenómica clínica de cyp2c8 y cyp2c9: Conceptos generales y aplicación al uso de AINE. *Farmacia Hospitalaria* 30 (4): 240-8.
- Martinez, C., G. Blanco, J. M. Ladero, E. Garcia-Martin, C. Taxonera, F. G. Gamito, M. Diaz-Rubio, and J. A. Agundez. 2004. Genetic predisposition to acute gastrointestinal bleeding after NSAIDs use. *British Journal of Pharmacology* 141 (2) (Jan): 205-8.
- Mas, S., A. Crescenti, J. M. Vidal-Taboada, S. Bergonon, F. Cuevillas, N. Laso, R. Molina, A. Ballesta, and A. Lafuente. 2005. Simultaneous genotyping of CYP2C9\*2, \*3, and 5' flanking region (C-1189T) polymorphisms in a spanish population through a new minisequencing multiplex single-base extension analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology* 61 (9) (Oct): 635-41.
- Masso Gonzalez, E. L., P. Patrignani, S. Tacconelli, and L. A. Garcia Rodriguez. 2010. Variability among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arthritis and Rheumatism* 62 (6) (Jun): 1592-601.
- McGettigan, P., and D. Henry. 2011. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: Systematic review of population-based controlled observational studies. *PLoS Medicine* 8 (9) (Sep): e1001098.
- McGettigan, P., and D. Henry. 2006. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: A systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 296 (13) (Oct 4): 1633-44.
- Mikhailidis, D. P., W. J. Jenkins, M. A. Barradas, J. Y. Jeremy, and P. Dandona. 1986. Platelet function defects in chronic alcoholism. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 293 (6549) (Sep 20): 715-8.
- Ministerio Sanidad, SPeI. 2011. Grupos terapéuticos y principios activos de mayor consumo por el sistema nacional de salud durante 2010. *Informe Farmacoterapéutico Del Sistema Nacional De Salud 2011; 35(4/2011)*.
- Moncada, S., and A. Higgs. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine* 329 (27) (Dec 30): 2002-12.
- Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43 (2) (Jun): 109-42.
- Moore, R. A., S. Derry, and H. J. McQuay. 2007. Cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Balancing gastrointestinal and cardiovascular risk. *BMC Musculoskeletal Disorders* 8 (Aug 3): 73.

- Mort, J. R., R. R. Aparasu, and R. K. Baer. 2006. Interaction between selective serotonin reuptake inhibitors and nonsteroidal antiinflammatory drugs: Review of the literature. *Pharmacotherapy* 26 (9) (Sep): 1307-13.
- Murad, F. 2006. Shattuck lecture. nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *The New England Journal of Medicine* 355 (19) (Nov 9): 2003-11.
- Musumba, C., D. M. Pritchard, and M. Pirmohamed. 2009. Review article: Cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 30 (6) (Sep 15): 517-31.
- Nardulli, G., and A. Lanas. 2009. Risk of gastrointestinal bleeding with aspirin and platelet antiaggregants]. *Gastroenterologia y Hepatologia* 32 (1) (Jan): 36-43.
- Nath, S. D., X. He, V. S. Voruganti, J. Blangero, J. W. MacCluer, A. G. Comuzzie, N. H. Arar, H. E. Abboud, and F. Thameem. 2009. The 27-bp repeat polymorphism in intron 4 (27 bp-VNTR) of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene is associated with albumin to creatinine ratio in mexican americans. *Molecular and Cellular Biochemistry* 331 (1-2) (Nov): 201-5.
- Nathan, C., and Q. W. Xie. 1994. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78 (6) (Sep 23): 915-8.
- Ofman, J.J., MacLean, C.H., Straus, W.L., Morton, S.C., Berger, M.L., Roth, E.A. & Shekelle, P. 2002. A metaanalysis of severe upper gastrointestinal complications of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *The Journal of rheumatology*, vol. 29, no. 4, pp. 804-812.
- Pettinella, C., M. Romano, L. Stuppia, F. Santilli, R. Liani, and G. Davi. 2009. Cyclooxygenase-1 haplotype C50T/A-842G does not affect platelet response to aspirin. *Thrombosis and Haemostasis* 101 (4) (Apr): 687-90.
- Piazuelo, E., J. Fuentes, M. A. Garcia-Gonzalez, P. Jimenez, and A. Lanas. 2008. A case-control study of the association between polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase and glycoprotein IIIa genes and upper gastrointestinal bleeding in users of low-dose aspirin. *Clinical Therapeutics* 30 (1) (Jan): 121-30.
- Pilotto, A., D. Seripa, M. Franceschi, C. Scarcelli, D. Colaizzo, E. Grandone, V. Niro, et al. 2007. Genetic susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drug-related gastroduodenal bleeding: Role of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Gastroenterology* 133 (2) (Aug): 465-71.
- Pincock, Stephen. 27 June 2009. Robert francis furchgott . *The Lancet* 373 (9682): 2194.

- Pirmohamed, M., S. James, S. Meakin, C. Green, A. K. Scott, T. J. Walley, K. Farrar, B. K. Park, and A. M. Breckenridge. 2004. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: Prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 329 (7456) (Jul 3): 15-9.
- Rockall, T. A., R. F. Logan, H. B. Devlin, and T. C. Northfield. 1995. Incidence of and mortality from acute upper gastrointestinal haemorrhage in the united kingdom. steering committee and members of the national audit of acute upper gastrointestinal haemorrhage. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 311 (6999) (Jul 22): 222-6.
- Sanchez-Diz, P., A. Estany-Gestal, C. Aguirre, A. Blanco, A. Carracedo, L. Ibanez, M. Passiu, et al. 2009. Prevalence of CYP2C9 polymorphisms in the south of europe. *The Pharmacogenomics Journal* 9 (5) (Oct): 306-10.
- Saag, M., Balu, R., Phillips, E., Brachman, P., Martorell, C., Burman, W., Stancil, B., Mosteller, M., Brothers, C., Wannamaker, P., Hughes, A., Sutherland-Phillips, D., Mallal, S., Shaefer, M. & Study of Hypersensitivity to Abacavir and Pharmacogenetic Evaluation Study Team 2008. High sensitivity of human leukocyte antigen-b\*5701 as a marker for immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 46, no. 7, pp. 1111-1118.
- Serrano, T., E. Piazuelo, R. Benito, S. Santolaria, and A. Lanás. 2002. Bleeding duodenal ulcer and association with polymorphism of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene. *Digestive Diseases and Sciences* 47 (5) (May): 996-1000.
- Shiotani, A., T. Sakakibara, M. Nomura, Y. Yamanaka, R. Nishi, H. Imamura, K. Tarumi, T. Kamada, J. Hata, and K. Haruma. 2010. Aspirin-induced peptic ulcer and genetic polymorphisms. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25 Suppl 1 (May): S31-4.
- Song, J., Yoon, Y., Park, K.U., Park, J., Hong, Y.J., Hong, S.H. & Kim, J.Q. 2003. Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentrations, and enzyme activity in cultured human endothelial cells. *Clinical chemistry*, vol. 49, no. 6 Pt 1, pp. 847-852.
- St Germaine, C. G., P. Bogaty, L. Boyer, J. Hanley, J. C. Engert, and J. M. Brophy. 2010. Genetic polymorphisms and the cardiovascular risk of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Cardiology* 105 (12) (Jun 15): 1740-5.
- Suleyman, H., B. Demircan, and Y. Karagoz. 2007. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports : PR* 59 (3) (May-Jun): 247-58.
- Tanus-Santos, J. E., and A. Casella-Filho. 2007. Endothelial nitric oxide

- synthase polymorphisms and susceptibility to hypertension: Genotype versus haplotype analysis. *Hypertension* 49 (1) (Jan): E1; author reply E2.
- Tran, N., B. S. Bharaj, E. P. Diamandis, M. Smith, B. D. Li, and H. Yu. 2004. Short tandem repeat polymorphism and cancer risk: Influence of laboratory analysis on epidemiologic findings. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 13 (12) (Dec): 2133-40.
- Trelle, S., S. Reichenbach, S. Wandel, P. Hildebrand, B. Tschannen, P. M. Villiger, M. Egger, and P. Juni. 2011. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Network meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 342 (Jan 11): c7086.
- Ulrich, C. M., J. Bigler, and J. D. Potter. 2006. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: Promise, perils and pharmacogenetics. *Nature Reviews.Cancer* 6 (2) (Feb): 130-40.
- Van Leerdam, M. E. 2008. Epidemiology of acute upper gastrointestinal bleeding. *Best Practice & Research.Clinical Gastroenterology* 22 (2): 209-24.
- Van Leerdam, M. E., E. M. Vreeburg, E. A. Rauws, A. A. Geraedts, J. G. Tijssen, J. B. Reitsma, and G. N. Tytgat. 2003. Acute upper GI bleeding: Did anything change? time trend analysis of incidence and outcome of acute upper GI bleeding between 1993/1994 and 2000. *The American Journal of Gastroenterology* 98 (7) (Jul): 1494-9.
- Van Oijen, M. G., R. J. Laheij, M. Koetsier, E. de Kleine, R. H. Te Morsche, L. A. van Kerkhoven, J. B. Jansen, and J. P. Drenth. 2006. Effect of a specific cyclooxygenase-gene polymorphism (A-842G/C50T) on the occurrence of peptic ulcer hemorrhage. *Digestive Diseases and Sciences* 51 (12) (Dec): 2348-52.
- Vane, J. R., and R. M. Botting. 1998. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine* 104 (3A) (Mar 30): 2S,8S; discussion 21S-22S.
- Wang, X. L., M. C. Mahaney, A. S. Sim, J. Wang, J. Wang, J. Blangero, L. Almasy, R. B. Badenhop, and D. E. Wilcken. 1997. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (11) (Nov): 3147-53.
- Wang, X. L., A. S. Sim, R. F. Badenhop, R. M. McCredie, and D. E. Wilcken. 1996. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nature*

*Medicine* 2 (1) (Jan): 41-5.

West, S.D. & Mercer, D.W. 2005. Bombesin-induced gastroprotection. *Annals of Surgery*, vol. 241, no. 2, pp. 227-231.

Xie, H. G., H. C. Prasad, R. B. Kim, and C. M. Stein. 2002. CYP2C9 allelic variants: Ethnic distribution and functional significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (10) (Nov 18): 1257-70.

Yanamandra, K., P. B. Boggs, T. F. Thurmon, D. Lewis, J. A. Bocchini Jr, and R. Dhanireddy. 2005. Novel allele of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in caucasian asthmatics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335 (2) (Sep 23): 545-9.

Yuan, Y., K. Tsoi, and R. H. Hunt. 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors and risk of upper GI bleeding: Confusion or confounding? *The American Journal of Medicine* 119 (9) (Sep): 719-27.

Zhou, Yong, and Lenard M. Lichtenberger. 2010. T1136 nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter lateral distribution within epithelial cell plasma membrane. *Gastroenterology* 138 (5, Supplement 1) (5): S-496.

Zintzaras, E., G. Kitsios, and I. Stefanidis. 2006. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: A meta-analysis. *Hypertension* 48 (4) (Oct): 700-10.

Anexos



## Anexo 1

Cuestionarios utilizados



Pegatina al  
ingreso

Código  
cuestionario

Polimorfismos genéticos y respuesta  
idiosincrásica a fármacos: Un estudio  
multicéntrico sobre el riesgo de  
hemorragias gastrointestinales.

Datos generales del paciente								
Nombre y apellidos*								
Fecha de nacimiento	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
Edad	<input type="text"/> <input type="text"/>							
Sexo	<input type="checkbox"/> hombre	<input type="checkbox"/> mujer						
Talla	____, ____ m							
Peso	_____ Kg							
Dirección*(Municipio)	_____		Tiempo <input type="checkbox"/> > o =3meses <input type="checkbox"/> <3meses					
Teléfono*								
Profesión								
Nº historia*								
Fecha ingreso/referencia	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
Fecha de entrevista	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
Etnia (se codificará a posteriori)	Cauasoide	<input type="text"/>	Propia	<input type="text"/>	Padre	<input type="text"/>	Madre	<input type="text"/>
	Negroide	<input type="text"/>	País de origen	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
	Mongoloide Dudoso	<input type="text"/>	Lengua nativa	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Estudios	<input type="text"/> <input type="text"/>							

¿Cuándo fue la última vez que acudió a un centro asistencial (urgencias, hospital de día) o ingresó en un hospital?					
Fecha de ingreso	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Fecha de alta	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/>	de	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Centro					
Motivo ingreso/preoperatorio					



Código cuestionario

TIPO DE CONTROL (Programados)			
TIPO*			Día inicio
<input type="checkbox"/>	<b>Adenoma de próstata /hiperplasia prostática</b>	No	SI NS
	Retención aguda de orina		<input type="text"/> de <input type="text"/> de <input type="text"/>
	Sonda vesical permanente en los últimos 3 mes (sólo se podrá incluir si ha llevado sonda en los últimos 15 días)		<input type="text"/> de <input type="text"/> de <input type="text"/>
<input type="checkbox"/>	<b>Hernia</b>	inicio tumoración	
	Dolor en los últimos 2 meses (sólo se podrá incluir si el dolor ha sido en los últimos 15 días antes del ingreso)		<input type="text"/> de <input type="text"/> de <input type="text"/>
<input type="checkbox"/>	<b>Fimosis, orejas en asa, ligadura de trompas, nódulo tiroides eutiroideo</b>		
<input type="checkbox"/>	<b>Cataratas</b>		
<input type="checkbox"/>	<b>Cirugía plástica</b>		
<input type="checkbox"/>	<b>Lipomas</b>		
<input type="checkbox"/>	<b>Quiste cuerdas</b>		
<input type="checkbox"/>	<b>Septoplastia</b>		
<input type="checkbox"/>	<b>Varicectomia</b>		
<input type="checkbox"/>	<b>Otros (Especificar)</b>		

Quando se trate de uno de estos tipos de controles hacer las siguientes preguntas:

¿Le han dicho que no tomara ningún medicamento en relación con esta operación, o ha dejado de tomar alguno por su cuenta?			
<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si → ¿cuáles? →			Fecha de la última ingesta
1			<input type="text"/> de <input type="text"/> de <input type="text"/>
2			<input type="text"/> de <input type="text"/> de <input type="text"/>
3			<input type="text"/> de <input type="text"/> de <input type="text"/>
9	Desconocido		<input type="text"/> de <input type="text"/> de <input type="text"/>

\* Señalar con una "X" el tipo de control de que se trate

Código cuestionario

<b>Antecedentes personales</b>						
	¿Ha tenido en el pasado?			¿Acudió a un hospital?		¿Cuántos años tenía?(¿Cuánto tiempo hace?)
	No	Si	NS	No	Si	
A. Úlcera de estómago						<input type="text"/> <input type="text"/> ( )
B. Úlcera de intestino						<input type="text"/> <input type="text"/> ( )
C. Úlcera inespecificada						<input type="text"/> <input type="text"/> ( )
D. Heces oscuras/negras						<input type="text"/> <input type="text"/> ( )
E. Vómitos oscuros /sanguinolentos						<input type="text"/> <input type="text"/> ( )
F. Heces con sangre (asegurar no hemorroides)						<input type="text"/> <input type="text"/> ( )
G. Molestias de estómago	Ardor/acidez/quemazón					
	Pesadez/digestión lenta					
	Dolor epigástrico					

<b>(Para los que tienen antecedentes de úlcera/sangrado)</b>	Episodio*	No	Si	NS	¿Conoce el nombre del medicamento?
¿Le han dicho alguna vez que había tenido ese episodio por algún medicamento?					

\*Especificar el código (A, B...E) del episodio de la tabla anterior. Si hay más de un medicamento asociado a un episodio, poner el código del episodio en otra línea, y poner el medicamento

<b>Antecedentes familiares</b>			
<b>(Para TODOS)</b>	No	Si	NS
¿Conoce Vd. algún familiar que padeciese o padezca sangrado de estómago o de intestino a causa de una úlcera?			
	No	Si	NS
¿Fue por algún medicamento?			
¿Parentesco?	<input type="checkbox"/> Padres, hermanos, hijos. <input type="checkbox"/> Abuelos, tíos directos		

Código cuestionario

### Antecedentes personales

	¿Ha tenido en el pasado?			¿Cuántos años tenía? (¿Cuánto tiempo hace?)
	No	Si	NS	
1. Enfermedad del corazón especificar _____				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
2. Enfermedad de la sangre especificar _____				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
3. Enfermedad renal especificar _____				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
4. Enfermedad respiratoria especificar _____				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
5. Enfermedad del hígado especificar _____				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
6. Hipertensión arterial				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
7. Colesterol elevado				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
8. Diabetes				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
9. Depresión				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
10. Migraña				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
11. Artrosis				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
12. Artritis				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
13. Osteoporosis				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
Otras enfermedades crónicas				
14. _____				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
15. _____				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )
16. _____				<input type="text"/> <input type="text"/> (    )

FECHA DE REFERENCIA:		Anamnesis Farmacológica										Código cuestionario						
		INDIC	NOMBRE DEL FÁRMACO CÓDIGO DEL FÁRMACO	FORMA FARM	Q	I	ÚLTIMO CONSUMO	SEMANA 1		SEMANA 2		SEMANA 3		SEMANA 4		ÚLTIMO CONSUMO	FREQ	DURACIÓN
								DÍAS	FREQ	DÍAS	FREQ	DÍAS	FREQ	DÍAS	FREQ			
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M
						D												D
						S												S
						NS												M



Código cuestionario 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<b>Información sobre la entrevista</b>			
	Paciente	Familiar	Cuidador
Presente en la entrevista			
Principal fuente de de información			
Nº de veces que se ha visitado/contactado con el paciente: ___			
Valoración de la fiabilidad de la entrevista (de 0 a 10): ___			

<b>Parámetros Clínicos (en el momento del ingreso/preoperatorio)</b>			
Nº concentrados hematíes		Urea plasmática	
Albúmina			
Tiempo Quick			
Creatinina plasmática			

<b>Informe de endoscopia (sólo casos)</b>											
Fecha de la endoscopia <input type="text"/> <input type="text"/> de <input type="text"/> <input type="text"/> de <input type="text"/> <input type="text"/>								<b>Códigos</b>			

<b>Diagnósticos al alta (ICD10) (sólo casos)</b>			
1		5	
2		6	
3		7	
4		8	

<b>Códigos de las muestras biológicas</b>			
	Código	Resultado H.pylori	Fecha de extracción
Sangre			<input type="text"/> <input type="text"/> de <input type="text"/> <input type="text"/> de <input type="text"/> <input type="text"/>
Suero/plasma			

Alta  Muerte  Fecha   de   de

## SÍNTOMAS

Ahora me gustaría saber qué medicamentos ha tomado usted en los últimos 2 meses, aunque sólo lo haya tomado 1 día, se lo haya recetado el médico o lo haya tomado por su cuenta, cualquier cosa, incluso pomadas, supositorios, jarabes,...

¿Qué fármacos ha tomado durante estos últimos dos meses?

Además de lo que me ha dicho ¿ha tomado algún medicamento durante estos dos últimos meses para alguna de estas molestias?

17. Gripe
18. Catarro
19. Fiebre
20. Tristeza
21. Nerviosismo/ansiedad
22. Problemas para dormir
23. Para estar bien
24. Luto reciente
25. Dolor de cabeza
26. Dolor de espalda
27. Dolor menstrual
28. Dolor de muelas
29. Hemorroides
30. Oído
31. Profilaxis gastritis
32. Otros dolores
33. Otros

Antes me ha dicho que había tenido (preguntar sobre los antecedentes patológicos). ¿Ha tomado para este problema algún medicamento en los últimos 2 meses?

- |                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| 1. Enfermedad del corazón  | 9. Depresión     |
| 2. Enfermedad de la sangre | 10. Migraña      |
| 3. Enfermedad renal        | 11. Artrosis     |
| 4. Enfermedad respiratoria | 12. Artritis     |
| 5. Enfermedad del hígado   | 13. Osteoporosis |
| 6. Hipertensión arterial   | 14. Otras        |
| 7. Colesterol elevado      | 15. Otras        |
| 8. Diabetes                | 16. Otras        |

Ahora me gustaría que se mirara estas fotos de medicamentos y me dijera si en este periodo de tiempo ha tomado alguno, aunque sólo lo haya tomado un día.



Pegatina al ingreso

Código cuestionario 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

1

Polimorfismos genéticos y respuesta idiosincrásica a fármacos: Un estudio multicéntrico sobre el riesgo de hemorragias gastrointestinales.

### Casos: exclusiones primarias

Datos generales del paciente	
Nombre y apellidos*	
Fecha de nacimiento	<input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>
Edad	<input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>
Sexo	<input type="checkbox"/> hombre <input type="checkbox"/> mujer
Nº historia*	
Fecha ingreso/referencia	<input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>
Fecha de exclusión	<input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>
Motivo de ingreso	

\* Información confidencial. No incluir en la base de datos

Informe de endoscopia											
Fecha de la endoscopia	Códigos										
<input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td></tr></table>										
.....	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td></tr></table>										
.....	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td></tr></table>										
.....	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td></tr></table>										
.....	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 15px; height: 15px;"></td><td style="width: 15px; height: 15px;"></td></tr></table>										

Código cuestionario 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<sup>2</sup>

<b>Motivo de exclusión</b>	
<18 años	<input type="checkbox"/>
Diagnóstico endoscópico excluible	<input type="checkbox"/>
Antecedentes patológicos	<input type="checkbox"/>
HDA intrahospitalarias	<input type="checkbox"/>
HDA sin diagnóstico de endoscopia o quirúrgico desde el ingreso hasta el alta.	<input type="checkbox"/>
Portadores de SNG o percutánea	<input type="checkbox"/>
Residencia en el área de estudio inferior a 3 meses	<input type="checkbox"/>
Otras: _____	<input type="checkbox"/>

Pegatina al  
ingreso

Código cuestionario

Polimorfismos genéticos y respuesta idiosincrásica a fármacos: Un estudio multicéntrico sobre el riesgo de hemorragias gastrointestinales.

## Casos: exclusiones secundarias

Datos generales del paciente				
Nombre y apellidos*				
Fecha de nacimiento	<input type="text"/>	de	<input type="text"/>	de
Edad	<input type="text"/>			
Sexo	<input type="checkbox"/> hombre	<input type="checkbox"/> mujer		
Talla	____, ____ m			
Peso	_____ Kg			
Dirección*(Municipio)	_____	Tiempo <input type="checkbox"/> > o =3meses <input type="checkbox"/> <3meses		
Teléfono*				
Profesión				
Nº historia*				
Fecha ingreso/referencia	<input type="text"/>	de	<input type="text"/>	de
Fecha de entrevista	<input type="text"/>	de	<input type="text"/>	de
Etnia (se codificará a posteriori)	Caucasoide		Propia	Padre
	Negroide			
	Mongoloide			
Dudoso				
Estudios	<input type="text"/>	País de origen		
		Lengua nativa		

\* Información confidencial. No incluir en la base de datos

¿Cuándo fue la última vez que acudió a un centro asistencial (urgencias, hospital de día) o ingresó en un hospital?	
Fecha de ingreso	<input type="text"/>
Fecha de alta	<input type="text"/>
Centro	
Motivo ingreso/preoperatorio	







Pegatina al ingreso

Código cuestionario 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

1

Polimorfismos genéticos y respuesta idiosincrásica a fármacos: Un estudio multicéntrico sobre el riesgo de hemorragias gastrointestinales.

### Control: exclusiones primarias y secundarias

Datos generales del paciente	
Nombre y apellidos*	
Fecha de nacimiento	
Edad	<input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>
Sexo	<input style="width: 20px;" type="text"/>
Nº historia*	<input type="checkbox"/> hombre <input type="checkbox"/> mujer
Fecha referencia	<input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>
Fecha de exclusión	<input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>
Motivo del preoperatorio	

\* Información confidencial. No incluir en la base de datos

Código cuestionario 

2

Motivo de exclusión	
Rehusa firmar el consentimiento informado	<input type="checkbox"/>
<18 años	<input type="checkbox"/>
Antecedentes patológicos	<input type="checkbox"/>
Portadores de SNG o percutánea	<input type="checkbox"/>
Residencia en el área de estudio inferior a 3 meses	<input type="checkbox"/>
Exitus antes de entrevistarlos	<input type="checkbox"/>
Estado grave	<input type="checkbox"/>
Alteraciones psíquicas (demencia, desorientación....)	<input type="checkbox"/>
Analfabetos	<input type="checkbox"/>
Ciegos, sordos	<input type="checkbox"/>
Vive en una residencia o institución cerrada y no conozca los fármacos que toma	<input type="checkbox"/>
Rehusa contestar la entrevista o no la realiza completamente	<input type="checkbox"/>
No ha sido posible la entrevista dentro de los primeros 15 días desde el ingreso	<input type="checkbox"/>
Otras: _____	<input type="checkbox"/>

Si tiene dos criterios de exclusión (uno primario y otro secundario) prima el primario sobre el secundario.

## Anexo 2

Hoja de anamnesis farmacológica



Código cuestionario

Anamnesis Farmacológica

INDIC	FECHA DE REFERENCIA:	NOMBRE DEL FÁRMACO CÓDIGO DEL FÁRMACO	FORMA FARM	Q	I	ÚLTIMO CONSUMO	SEMANA 1		SEMANA 2		SEMANA 3		SEMANA 4		MES 2 (DÍAS 29-60)					
							DÍAS		DÍAS		DÍAS		DÍAS		FREQ	FREQ	FREQ	FREQ	ÚLTIMO CONSUMO	DURACIÓN
							1	2	3	4	5	6	7	1						
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				
							D	N	N	N	N	N	N	N	D	D				
							S	S	S	S	S	S	S	S	S	M				
							NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	A				



## Anexo 3

### Guía de codificación



## GUIA DE CODIFICACIÓN

<u>CODIFICACIÓN FORMA FARMACÉUTICA</u>		<u>FRECUENCIA (semanas 1 a 4)</u>	
Cápsulas, grageas, comprimidos	<b>81</b>		
Inyectables	<b>82</b>	Diario	<b>01</b>
Supositorios	<b>83</b>	4-6 días/semana	<b>02</b>
Otros	<b>84</b>	2-3 días/semana	<b>03</b>
Tópica piel (pomadas, parches)	<b>85</b>	1 día/semana	<b>04</b>
Líquidos, vía oral (jarabes, granulados, efervescentes)	<b>86</b>	Desconocido	<b>99</b>
Endovenosa	<b>87</b>		
Inhalatoria	<b>88</b>	<u>FRECUENCIA (mes 2)</u>	
Desconocido	<b>99</b>	Diario	<b>01</b>
		4-6 días/semana	<b>02</b>
		2-3 días/semana	<b>03</b>
		1 día/semana	<b>04</b>
		2-4 días/mes	<b>05</b>
		1 día/mes	<b>06</b>
		Ocasional <sup>a</sup>	<b>07</b>
		Desconocido	<b>99</b>
		Cíclica <sup>b</sup>	
		Intermitente <sup>c</sup>	
		<u><sup>a</sup> FRECUENCIA OCASIONAL</u>	
		Es un uso esporádico, poco frecuente, sin ningún modelo establecido de uso.	
		<u><sup>b</sup> FRECUENCIA CÍCLICA</u>	
		Escribir el número de <b>días por mes</b> .	
		Si son <b>menos de 10</b> , preceder el número por un <b>5</b> .	
		<u><sup>c</sup> FRECUENCIA INTERMITENTE</u>	
		Escribir el número de <b>semanas por año</b> y precederlas por un <b>6</b> o el número de <b>meses por año</b> y precederlas por un <b>7</b> .	
		<u>DURACIÓN (mes 2)</u>	
		Toda la vida	<b>97</b>
		<u>EQUIVALENCIAS en medidas de cerveza</u> (para el estudio).	
		- 1 caña = 2 cortos = 2 zuritos = 1 quinto =	
		1 cuarto = un botellín de 25	
		- 2 cañas = 1 lata = 1 tubo = 1 mediana = un botella de 33	
		- 3 cañas = una jarra	
		- 4 cañas = un tanque	

<u>CODIFICACIÓN Q</u>	
Médico	<b>1</b>
Farmacéutico	<b>2</b>
Enfermera	<b>3</b>
Vecino	<b>4</b>
Familiar	<b>5</b>
Cuidador	<b>6</b>
Enfermo	<b>7</b>
Amigo	<b>8</b>

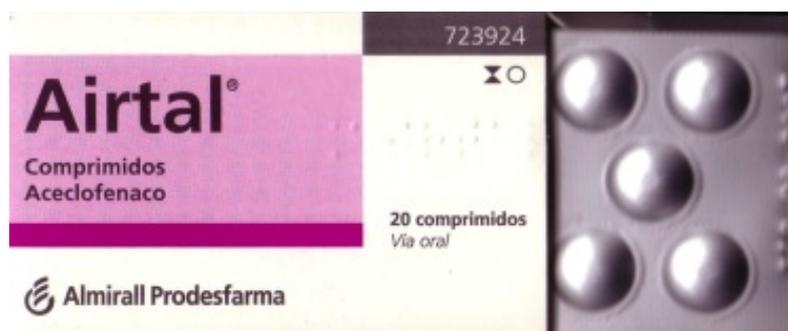
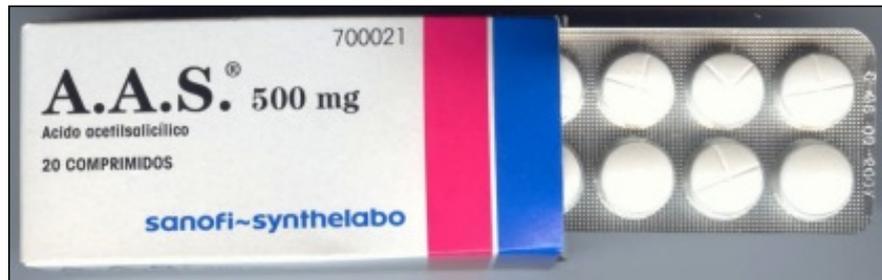
<u>CODIFICACIÓN I</u>	
1. Medicamento recordado en la pregunta abierta.	
2. Medicamento recordado a partir de la hoja de síntomas y/o repaso de los antecedentes.	
3. Medicamento recordado a partir del catálogo de fotos.	
<u>USO (semanas 1 a 4)</u>	
<b>N</b> = No, no lo ha tomado, o bien, no recuerda si aquella semana lo ha tomado. Dejar en blanco la frecuencia y los días.	
<b>S</b> = Sí, sí lo ha tomado. Hay que marcar exactamente qué días de la semana.	
<b>NS</b> = no sabe. Lo ha tomado aquella semana, pero no recuerda qué días en concreto se lo tomó, hay que poner frecuencia y no marcar ningún día.	



## Anexo 4

### Modelos de Pront-Cards





Modelo de *Pront-Cards* utilizado en nuestro estudio (AINE)



Modelo de *Pront-Cards* utilizado en nuestro estudio (antidepresivos)



Modelo de *Pront-Cards* utilizado en nuestro estudio (antiagregantes)



**Anexo 5**  
Consentimientos informados



## **Modelo de consentimiento informado utilizado en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid y el Hospital de Galdakao.**

Introducción.- El riesgo de trastornos hemorrágicos producidos por fármacos es un problema sanitario muy importante por la gravedad potencial que reviste este tipo de procesos; máxime cuando los fármacos a estudiar (antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina) son de elevado consumo y el riesgo individual de producción de hemorragias puede verse potenciado por su administración conjunta.

Los enzimas biotransformadores de fármacos son las responsables de su eliminación (detoxificación) transformándolos en otros productos, por lo general menos activos. La capacidad metabolizadora varía de una persona a otra dependiendo de su dotación enzimática que está sometida a influencias genéticas y ambientales.

El hecho de que los enzimas metabolizadores estén sometidos a control genético, posibilita en nuestro caso poder establecer una asociación entre el perfil genético de una persona y el riesgo de padecer complicaciones hemorrágicas.

Objetivo del estudio.- Valorar del riesgo de hemorragias por consumo de antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y su relación con los polimorfismos de los genes (genes diferentes) codificadores de los enzimas metabolizadores de fármacos.

Obtención de las muestras de sangre para el análisis genético.- Se le extraerá una muestra de sangre (alrededor de 10 centímetros cúbicos) por el procedimiento habitual para efectuar sobre dicha muestra un análisis genético de los genes de dichos enzimas metabolizadores.

Confidencialidad.- Las muestras serán utilizadas solo para los fines del estudio. El equipo de este estudio mantendrá confidencialidad de la información médica y genética obtenida. A cada muestra se le asociará un código con el que será posible identificar su muestra. Por otro lado, usted podrá tener acceso a su información genética que sea determinada durante el estudio.

Participación voluntaria.- Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, por lo que puede rechazar tomar parte en el estudio.

*Influencia de los polimorfismos genéticos en las hemorragias gastrointestinales asociadas a fármacos: Un estudio multicéntrico de casos y controles*

Formulario de consentimiento

[Investigador principal: Dr. Carmelo Aguirre Gómez/ Dr. Alfonso Carvajal García-Pando

Hospital de Galdakao.Unidad de Farmacovigilancia del País Vasco/ Hospital Universitario de Valladolid]

Apellidos: ..... Nombre .....

Doy mi libre consentimiento para participar en este estudio. He leído la hoja informativa sobre el proyecto. He comprendido que la investigación es una contribución a los conocimientos médicos y que no forma parte de ningún tratamiento que pueda estar recibiendo en la actualidad. Sé que puedo retirar mi consentimiento en cualquier fase del procedimiento.

Estoy de acuerdo en que, tras eliminar mi nombre y mis datos identificativos, el DNA preparado a partir de la muestra de sangre se utilice en estudios de variación genética (secuencia del DNA). Estos estudios incluyen la investigación de predictores genéticos de reacciones a fármacos, aunque no están limitados a ella.

He comprendido que no puedo reclamar ningún derecho en la utilización no restringida de esta muestra de sangre o de cualquier material preparado a partir de ella. Estoy de acuerdo en que esta muestra de sangre pueda utilizarse en el futuro en otros estudios de variación genética y compartida con laboratorios de otros centros.

Doy mi permiso para que los datos de mi historia clínica, incluidas las sospechas de reacciones a medicamentos, sean utilizados por el equipo de investigación para cotejarlos con la muestra de sangre, entendiendo que tras esta comprobación se eliminará del registro toda la información que pudiera identificarme.

Firmado.....

Fecha.....

## Modelo de consentimiento informado utilizado en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón de Barcelona.

### CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE PARA LAS MUESTRAS DESTINADAS A LA INVESTIGACIÓN GENÉTICA

**Estudio epidemiológico:** INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LAS HEMORRAGIAS GASTROINTESTINALES ASOCIADAS A FÁRMACOS: UN ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE CASOS Y CONTROLES

Este documento de consentimiento puede contener palabras que usted no comprende. Por favor, pida al médico del estudio o al personal que trabaja con él que le explique cualquier palabra o información que no entienda perfectamente.

**Investigador:** Luisa Ibáñez Mora. Cristina Rebordosa

**Promotor:** Fondo de Investigación Sanitaria. Instituto de Salud Carlos III. Subdirección General de Investigación Sanitaria. Ministerio de Sanidad y Consumo.

#### Introducción:

El propósito de este documento de consentimiento informado es proporcionarle información para que pueda decidir si quiere que le extraigan una muestra de sangre adicional a propósito del estudio epidemiológico en el que estaría usted participando. Esta muestra de sangre se utilizará en una investigación genética tal y como se comenta más adelante. **Este documento de consentimiento es otro distinto del consentimiento para acceder a participar en el estudio epidemiológico y no pretende reemplazar o modificar a este último. La participación en esta investigación genética es voluntaria. Si decide que no desea participar en ella, puede seguir participando en el estudio epidemiológico, siempre que haya dado su consentimiento para ello. En total, se espera que en el estudio participen unos 3000 pacientes.**

#### Investigación:

El material obtenido de su muestra de sangre se utilizará en una investigación genética que tiene como objetivo estudiar los factores genéticos que pueden tener importancia en la aparición de ciertos efectos adversos a medicamentos en las personas. Asimismo el material obtenido de su muestra de sangre se podría conservar indefinidamente ("en un banco de muestras") para poder realizar futuras investigaciones genéticas acerca de la aparición de efectos indeseados a medicamentos, **que podría ser compartida con laboratorios de otros países.** Con la firma de este documento de consentimiento, usted está concediendo al Promotor (Fondo de Investigación Sanitaria) su permiso para utilizar el material obtenido de su sangre en todas las investigaciones mencionadas.

#### Procedimiento:

Si accede a participar, **se le extraerá durante su estancia en el hospital unos 6 ml adicionales de sangre.** Esta muestra se enviará entonces al investigador del laboratorio de hematología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón, que obtendrá el material genético (ADN) de la muestra. El ADN es un material genético de su organismo que sirve para elaborar proteínas, entre ellas las relacionadas con el metabolismo de los fármacos.

**Riesgos:**

La muestra de sangre para la investigación genética mencionada se extraerá al mismo tiempo que las muestras para las demás pruebas de laboratorio que usted necesita, por tanto su extracción no conlleva un riesgo adicional.

**Beneficios:**

Usted no obtendrá un beneficio directo como resultado de la investigación genética practicada con el material obtenido de su muestra de sangre. Un posible beneficio indirecto es que su participación pueda contribuir a comprender mejor los factores que pueden influir en el desarrollo de efectos indeseados a medicamentos y de este modo poder prevenirlos mejor.

**Retirada del consentimiento:**

En todo momento usted puede retirar este consentimiento y suspender su participación en la investigación genética antes descrita, sin que ello afecte su participación en el estudio epidemiológico. En ese caso debe comunicar a la investigadora *Luisa Ibáñez Mora*, teléfono 93 428 30 29, o a la persona designada por ella que desea retirar su consentimiento y suspender su participación en ella.

**Destrucción de las muestras:**

El investigador retendrá los archivos que relacionen su identidad con la muestra de sangre durante el periodo de tiempo que obligue la legislación vigente. Hasta que se destruyan esos documentos, usted puede solicitar la destrucción de su muestra de sangre y el material obtenido de ella. En ese caso debe comunicar a la investigadora o a la persona por ella designada que desea que destruyan su muestra de sangre y el material obtenido de ella. La investigadora se lo notificará al laboratorio de hematología, que destruirá todas sus muestras de sangre y el material obtenido de ellas que todavía conserve.

**Confidencialidad:**

La información obtenida en la investigación genética practicada con material procedente de su sangre, se conservará de manera confidencial, de modo que ni la investigadora ni el promotor (Fondo de Investigación Sanitaria) relacionarán con su identidad los resultados de su investigación genética individual. Su muestra de sangre y el material procedente de ella recibirán un código de muestra, que sólo se relacionará con información relativa a su edad, sexo, origen étnico, estado de salud y otros datos como por ejemplo, su ingesta de medicamentos. Su nombre y número de la seguridad social (o cualquier otra información que lo identifique a usted en exclusiva) no se vinculará a la muestra que haya donado.

La investigación genética no tiene como objeto facilitarle información clínica. Usted sabe y está de acuerdo en ello, que no se le comunicarán los resultados de su investigación genética individual. La información resultante de la investigación no se incluirá en sus documentos médicos. Ni usted, ni miembros de su familia, terceras personas, ni los investigadores tendrán acceso a los resultados de su investigación genética individual.

Al firmar este documento, es consciente de que sus documentos pueden ser revisados. Sus datos se encontrarán protegidos por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de datos.

**Beneficios :**

Desconocemos por el momento si los resultados de esta investigación podrían utilizarse en el desarrollo comercial de nuevos medicamentos o técnicas

diagnósticas, si así fuera, usted sabe y está de acuerdo en ello, que no recibirá beneficios ni compensaciones por este tipo de desarrollos, sobre los que no tendrá derecho alguno.

**Preguntas/Información:**

Si tiene alguna pregunta acerca de la obtención de las muestras o la investigación genética que se han mencionado, póngase en contacto con *Luisa Ibáñez Mora o Cristina Rebordosa, en el teléfono 93 428 30 29.*

**Revisión ética:**

Un Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) formado por un grupo de personas, médicos y otros profesionales, han revisado la información del estudio con el objetivo de proteger al sujeto participante en el mismo.

**Consentimiento informado:**

Título del estudio:

"Influencia de los polimorfismos genéticos en las hemorragias gastrointestinales asociadas a fármacos: un estudio multicéntrico de casos y controles"

Yo, .....  
(nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con .....  
(nombre y apellidos del monitor)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Fecha

Firma del participante

ortuu klaw  
24/1/07

N.º de identificación del paciente.....  
N.º de identificación del centro.....

**Polimorfismos genéticos y respuesta idiosincrásica a fármacos: un estudio multicéntrico sobre riesgo de hemorragias gastrointestinales.**

**Formulario del consentimiento**

Centro Investigador: Fundació Institut Càtala de Farmacologia  
Investigador principal: Luisa Ibáñez Mora

Apellidos: ..... Nombre .....

Doy mi pleno consentimiento, de manera libre, para participar en este estudio. **He comprendido la información que me han ofrecido sobre este proyecto (He leído la hoja informativa sobre el proyecto).** He comprendido que la investigación es una contribución a los conocimientos médicos y que no forma parte de ningún tratamiento que pueda estar recibiendo en la actualidad. Sé que puedo retirar mi consentimiento en cualquier fase del procedimiento. Estoy de acuerdo en que, tras eliminar mi nombre y mis datos identificativos, el DNA preparado a partir de la muestra de sangre se utilice en estudios de variación genética (secuencia del DNA). Estos estudios incluyen la investigación de predictores genéticos de reacciones a fármacos, aunque no están limitados a ella.

He comprendido que no puedo reclamar ningún derecho en la utilización no restringida de esta muestra de sangre o de cualquier material preparado a partir de ella. **Estoy de acuerdo en que esta muestra de sangre se pueda transformar en una línea celular permanente**, que estará a disposición de investigadores cualificados para la investigación, para la enseñanza y para propósitos terapéuticos o diagnósticos. **He comprendido que las muestras de DNA o las líneas celulares preparadas a partir de la muestra pueden ser compartidas con laboratorios de otros países.**

Doy mi permiso para que los datos de mi historia clínica sean utilizados por el equipo investigador para cotejarlos con la muestra de sangre, entendiendo que tras esta comprobación se eliminará del registro toda la información que pudiera identificarme.

Firmado.....  
Fecha.....

Confirmando que he explicado al participante el carácter y el propósito del proyecto de investigación:

Firmado.....(miembro del equipo investigador)

Copia del formulario del consentimiento entregado al paciente



---

## Modelo de consentimiento informado utilizado en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

*Influencia de los polimorfismos genéticos en las hemorragias gastrointestinales asociadas a fármacos: Un estudio multicéntrico de casos y controles*

---

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Introducción.** El riesgo de trastornos hemorrágicos producidos por fármacos es un problema sanitario muy importante por la gravedad potencial que reviste este tipo de procesos; máxime cuando los fármacos a estudiar (antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina) son de elevado consumo y el riesgo individual de producción de hemorragias puede verse potenciado por su administración conjunta.

Los enzimas biotransformadores de fármacos son las responsables de su eliminación (detoxificación) transformándolos en otros productos, por lo general menos activos. La capacidad metabolizadora varía de una persona a otra dependiendo de su dotación enzimática que está sometida a influencias genéticas y ambientales.

El hecho de que los enzimas metabolizadores estén sometidas a control genético, posibilita en nuestro caso poder establecer una asociación entre el perfil genético de una persona y el riesgo de padecer complicaciones hemorrágicas.

**Objetivo del estudio.** Valorar el riesgo de hemorragias por consumo de antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y su relación con los polimorfismos de los genes (genes diferentes) codificadores de los enzimas metabolizadores de fármacos.

**Obtención de las muestras de sangre para el análisis genético.** Se le extraerá una muestra de sangre (alrededor de 10 centímetros cúbicos) por el procedimiento habitual para efectuar sobre dicha muestra un análisis genético de los genes de dichos enzimas metabolizadores.

**Confidencialidad.** Las muestras serán utilizadas solo para los fines del estudio. El equipo de este estudio mantendrá confidencialidad de la información médica y genética obtenida. A cada muestra se le asociará un código con el que será posible identificar su muestra. Por otro lado, usted podrá tener acceso a su información genética que sea determinada durante el estudio.

**Participación voluntaria.** Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, por lo que puede rechazar tomar parte en el estudio, o abandonarlo una vez iniciado, sin dar explicaciones o cuando así lo desee.

**Institución:** Facultad de Medicina (Departamento de Medicina Preventiva) y Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (Servicio de Medicina Preventiva, Servicio de Farmacología Clínica, Servicio de Aparato digestivo).

**Investigador principal del estudio:** Adolfo Figueiras Guzmán (Departamento de Medicina Preventiva de la Universidad de Santiago de Compostela. Tel: 981581237).

**Monitor:** María José López Otero (Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela).

Formulario de aceptación del estudio: “Influencia de los polimorfismos genéticos en las hemorragias gastrointestinales asociadas a fármacos: Un estudio multicéntrico de casos y controles”

Yo \_\_\_\_\_, declaro bajo mi responsabilidad que he recibido información sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He sido informado por \_\_\_\_\_

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio: 1. cuando quiera; 2. sin tener que dar explicaciones; 3 sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Santiago de Compostela,

Fecha

Firma del participante

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma del monitor

\_\_\_\_\_

## Anexo 6

### Modelo de Base de Datos



**Estudio analítico HDA. Polimorfismos genéticos y respuesta idiosincrásica a fármacos**

Acceso a datos - #150015010098

**Anamnesis farmacológica (página 6)**

**Datos iniciales**

Indicación: 08 Forma fam.: 81

**Fármaco**

Término: Diamicron ESP

Código: 743609 Dic.: ESPBOT1203 ESP

Nombre: DIAMICRON 80 MG 20 COMPRIMIDOS

**Parámetros**

Q: 1 I: 1

Último consumo: 01 Medido en: Días

**Semana 1 --> 05/05/2004 - 29/04/2004**

Dato: Sí Frec.: 1 Dos.:

Días: 1 2 3 4 5 6 7

Dosis: 00003 00003 00003 00003 00003 00003 00003

**Semana 2 --> 28/04/2004 - 22/04/2004**

Dato: Sí Frec.: 1 Dos.:

Días: 1 2 3 4 5 6 7

Dosis: 00003 00003 00003 00003 00003 00003 00003

**Semana 3 --> 21/04/2004 - 15/04/2004**

Dato: Sí Frec.: 1 Dos.:

Días: 1 2 3 4 5 6 7

Dosis: 00003 00003 00003 00003 00003 00003 00003

**Mes 2**

Último consumo: 29 Días Frec.: 1

Dosis: 00003 Duración: 03 Años

3 / 3

Consultar/Modificar número de protocolo

Modelo base de datos utilizada en nuestro estudio



## Anexo 7

Base de datos de información genética

Protocolo de extracción de ADN a partir de linfocitos



Base de datos Pharm GKB.

En esta base de datos se puede obtener información sobre las variantes genéticas de los diferentes genes relacionados con medicamentos.

The screenshot shows the PharmGKB website interface. At the top, there is a search bar and navigation links. The main content area is titled "Gene: PTGS1" and "prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)". Below this, there are tabs for "Clinical PGx", "PGx Research", "Overview", "Pathways", "Is Related To", "Publications", and "Downloads/Link Outs".

The "PGx Research" tab is active, displaying a table of variants. The table has the following columns: Variant ID, Alternate Names / Tag SNPs, Drugs, Alleles (+/- chr strand), Function, and Amino Acid Translation. Below the table, there is a "view legend" link.

Variant ID	Alternate Names / Tag SNPs	Drugs	Alleles (+/- chr strand)	Function	Amino Acid Translation
rs10306114	-1140A>G, -287A>G, -762A>G, -842A>G, -890A>G, -920A>G, 12513252A>G, 4294A>G, 54297054A>G, A-342G	clopidogrel aspirin	A > G	5' Flanking	
rs10306135	-204-2512A>T, -233-2483A>T, -252A>T, 125137695A>T, 175-2512A>T, 20-2483A>T, 54302227A>T, 623-2483A>T, 9467A>T, 95-2483A>T	Antiinflammatory agents, non-steroids	A > T	Intronic	
rs12353214	125161870C>T, 54326402C>T	Antiinflammatory agents, non-steroids	C > T	Not Available	
rs1238913	-276T>C, -277T>C, -306T>C, 102T>C, 125133479T>C, 221T>C, 328T>C, 5251T>C, 54298011T>C, C221, Trp6Arg	aspirin	T > C	5' UTR	Trp6Arg
rs3842787	-248C>T, -249C>T, -278C>T, 125133907C>T, 130C>T, 356C>T, 50C>T, 5279C>T, 54298035C>T, C>T, PTGS1, P17L, Pro17Leu	celecoxib rofecoxib aspirin indomethacin	C > T	5' UTR	Pro17Leu
rs52788	1167C>A, 125143792C>A, 15564C>A, 312C>A, 495C>A, 54339324C>A, 564C>A, 629C>A, 600C>A, C544A, Gly104=, Gly165=, Gly188=, Gly213=	aspirin	C > A	Synonymous	Gly188Gly
rs52789	1237C>A, 125143873C>A, 15745C>A, 360C>A, 54308605C>A, 566C>A, 634C>A, 709C>A, 760C>A, C714A, Leu129Met, Leu189Met, Leu212Met, Leu237Met	aspirin	C > A	Missense	Leu212Met

Protocolo de extracción según manual del kit comercial QIAamp DNA blood mini kit (250)<sup>®</sup> (Cat.no 51106), de la casa comercial QIAGEN en Alemania:

1. Pipetear 20 µL de Proteasa QIAGEN (o proteinasa K) en el fondo de un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
2. Añadir el pellet de leucocitos resuspendido en 200 µL de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, solución de las sales NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) al tubo de microcentrífuga.
3. Añadir 200 µL de tampón AL a la muestra y mezclar con el vortex durante 15 s.
4. Incubar a 56°C durante 10 min.
5. Realizar un golpe de centrifuga (para recoger restos de muestra en las paredes del tubo o en el tapón).
6. Añadir 200 µL de etanol (96-100%) y mezclar con ayuda del vortex durante 15 s. Dar de nuevo un golpe de centrifuga.
7. Transferir el contenido del tubo de microcentrífuga a una columna QIAmp (contenida en un tubo colector de 2 mL), con cuidado de no sobrepasar el borde de la columna, cerrar el tapón y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Colocar la columna en otro tubo colector de 2 mL y desechar el tubo colector con el líquido eluído.
8. Añadir a la columna 500 µL de tampón AW1. Cerrar el tapón y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Colocar la columna en otro tubo colector de 2 mL y desechar el tubo colector con el líquido eluído.
9. Añadir 500 µL de tampón AW2. Cerrar el tapón y centrifugar a 14000 rpm durante 3 min. Colocar la columna en otro tubo colector de 2 mL, desechar el tubo colector con el líquido eluído.
10. Volver a centrifugar a velocidad máxima durante 1 min (de esta forma se elimina cualquier resto de tampón AW2 que pudiera interferir en reacciones posteriores), desechar el tubo con el líquido eluído.
11. Colocar la columna en un eppendorf estéril de 1,5 mL y añadir 200 µL de tampón AE o agua destilada.
12. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min (incubar la columna con AE a temperatura ambiente durante 5 min hace que aumente el rendimiento de la extracción).
13. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. El eluído final contiene el ADN purificado.

## Anexo 8

Condiciones de PCR para las sondas Taqman y termociclador de PCR-rt empleados en el estudio de los polimorfismos de *COX-1*



## **Termociclador en tiempo real LightCycler 480 (Roche)**



### **Condiciones PCR**

10 ng de DNA por reacción (Aproximadamente)

Oligos: 600 nM

Sondas TaqMan 150 nM marcadas respectivamente en VIC y FAM

### **Condiciones Universales para sondas TaqManPCR**

10 min @ 95 °C

45 ciclos de:

10 sec @ 95 °C

20 sec @ 60 °C.

1 sec @ 72 °C

Asignación de alelos automática con revisión posterior



## Anexo 9

### Aprobaciones de los Comités Éticos



Informe del Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valladolid



**COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN**

**ACEPTACIÓN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**

*D<sup>a</sup> ANA ALMARAZ GÓMEZ, como Presidenta de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario de Valladolid.*

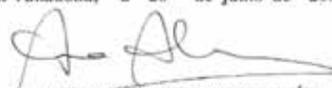
**CERTIFICO:**

Que ha sido sometido a esta Comisión para su valoración el Proyecto de Investigación titulado:

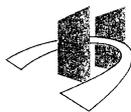
**“ Polimorfismos Genéticos y respuesta idiosincrásica a fármacos: un estudio multicéntrico sobre riesgo de hemorragias gastrointestinales “**

Que una vez estudiado dicho Proyecto, así como la capacidad del equipo investigador y los medios disponibles para su realización, esta Comisión ha evaluado favorablemente el mismo y su conducción por el **Doctor ALFONSO CARVAJAL GARCÍA-PANDO** , como Investigador/a Principal.

En Valladolid, a 20 de junio de 2005



LA PRESIDENTA DE LA COMISIÓN,



HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO  
Avda. Ramón y Cajal, 3  
Tfno. 983 42 00 00  
47005 - VALLADOLID



**COMISION DE INVESTIGACION**

**RESUMEN DEL INFORME REFERENTE AL PROYECTO DE INVESTIGACION TITULADO:**

“ Polimorfismos genéticos y respuesta idiosincrásica a fármacos: un estudio multicéntrico sobre riesgo de hemorragias gastrointestinales”

**INVESTIGADOR PRINCIPAL**

DR. ALFONSO CARVAJAL GARCIA PANDO. FACULTAD DE MEDICINA.

**EQUIPO INVESTIGADOR :**

DRA. CRISTINA MINER  
DR. LUIS MARTÍN ARIAS.  
DR. ELADIO VELASCO.  
DRA. LOURDES DEL OLMO. (Servicio de Digestivo H.C.U.V.)

De la atenta consideración de los datos aportados y en virtud de los motivos que se indican, esta Comisión de Investigación ha resuelto:

- Aceptar el Proyecto de Investigación.
- Aceptar el Proyecto de Investigación, previa revisión de los aspectos que se indican a continuación: (observaciones)
- Rechazar el proyecto de investigación en virtud de los aspectos que se indican a continuación: (observaciones).

**OBSERVACIONES :**

\*\* Pendiente de evaluación definitiva en la próxima reunión de la Comisión.

En Valladolid, a 7 de abril de 2005

LA PRESIDENTE DE LA COMISION,



Dra. Ana Almaraz Gómez.



## Informe de Comité Ético del Hospital Universitario Vall d'Hebrón



La Sra. Mireia Navarro, secretaria técnica del CEIC del Hospital Universitario Vall d'Hebron,

### CERTIFICA:

Que en el acta número 197 que corresponde a la reunión del CEIC de 23 de marzo de 2012, consta lo siguiente:

El CEIC del HUVH considera que el estudio "*Influencia de los polimorfismos genéticos en las hemorragias gastrointestinales asociadas a fármacos: un estudio multicéntrico de casos y controles*", cuyo investigador principal en nuestro centro es la Dra. Luisa Ibañez Mora, es adecuado desde el punto de vista ético y científico.

Firmado digitalmente por MIREIA NAVARRO SEBASTIAN  
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES ou=Vegeu <https://www.catcert.cat/veridCAT> (c)03, ou= Serveis Publics de Certificacio  
CPIXSA-2, sn=NAVARRO SEBASTIAN, givenName=MIREIA,  
serialNumber=38121226Z, cn=MIREIA NAVARRO SEBASTIAN  
Fecha: 2012.03.29 15:34:59 +02'00'

Sra. Mireia Navarro  
Secretaria del CEIC  
Barcelona, 28 de enero de 2012



## Informe del Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela



Edificio Administrativo San Lázaro, s/n  
15771 Santiago de Compostela  
Telf. (981) 54 64 25 — Fax (981) 54 18 04  
E-mail: [ceic@mail.xunta.es](mailto:ceic@mail.xunta.es)

### Informe del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

D. Miguel Amor Otero, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

#### CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado en su reunión del 13 de febrero de 2002 la propuesta de Adolfo Figueiras Guzmán para que se realice el estudio titulado "*Influencia de los polimorfismos genéticos en las hemorragias gastrointestinales asociadas a fármacos: Un estudio multicéntrico de casos y controles*", con nuestro número de registro: **2002/020**, y considera que:

Se cumplen los requisitos éticos aplicables a este tipo de estudios.

Y que este Comité acepta, de conformidad con sus Procedimientos Normalizados de Trabajo, que dicho estudio sea realizado en el Centro/s C.H. Universitario de Santiago por Adolfo Figueiras Guzmán como investigador/es principal/es.

Lo que firmo en Santiago de Compostela a 14 de febrero de 2002.

Firmado:  
  
Miguel Amor Otero




**NOTA genérica:** Debido a las connotaciones éticas y la especial naturaleza del consentimiento informado, es exigible que, con anterioridad al reclutamiento de pacientes, esté disponible una versión fidedigna y redactada en gallego normativo del mismo (hojas de información y de firmas). Garantizándose así, el derecho de los gallegos al uso de su lengua oficial y la completa comprensión del consentimiento informado.



## Informe del Comité Ético del Hospital de Galdakao



Osakidetza  
Servicio vasco de salud

GALDAKAOKO OSPITALEA  
HOSPITAL DE GALDAKAO  
Barrio Labeaga, s/n.  
Teléfono 94 400 70 00  
48960 - GALDAKAO (Bizkaia)

### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don **RAMON SARACHO ROTAECHE**, Presidente del comité Ético de Investigación Clínica del HOSPITAL DE GALDAKAO

#### CERTIFICA

- Que habiendo evaluado el C.E.I.C, en reunión celebrada el 20 de febrero de 2002, el estudio: "Influencia de los polimorfismos genéticos en las hemorragias gastrointestinales asociadas a fármacos: Un estudio multicéntrico de casos y controles", cuyo investigador principal es el Dr. Carmelo Aguirre, lo considera **APROBADO**

Lo que firmo en Galdakao a 28 de febrero de 2002

Fdo. Dr. Ramón Saracho.  
PRESIDENTE C.E.I.C.



## Anexo 10

Otros resultados de interés



En la tabla A se muestra el número de individuos que presentó un determinado síntoma dentro del grupo de casos de hemorragia digestiva y el porcentaje de la muestra global que representa. Y en la tabla B se muestra el número de controles por cada centro según el motivo de ingreso.

Tabla A. Distribución de frecuencias y porcentaje de pacientes en los que aparecieron dichos síntomas

Síntoma	Número de episodios	% del total de la muestra
Melenas	398	24,4
Mareos	290	17,7
Astenia	238	14,6
Palidez	219	13,4
Sudores	198	12,1
Vómitos oscuros/sanguinolentos	188	11,5
Dolor epigástrico	140	8,6
Ardor/acidez/quemazón	95	5,8
Pesadez/digestión lenta	91	5,6
Pérdida de conocimiento	81	5,0
Hematequesis	61	3,7

Tabla B. Distribución de los controles por centros según el tipo de patología que motivó el ingreso

	Santiago	Barcelona	Valladolid	Galdakao	Total
	n %	n %	n %	n %	n %
Cataratas	139 (24,0)	150 (25,9)	75 (12,9)	216 (37,2)	580 (50,0)
Hernia inguinal o umbilical	85 (29,3)	77 (26,6)	60 (20,7)	68 (23,4)	290 (25,0)
Varicectomía	27 (38,0)	0 (0,0)	21 (29,6)	23 (32,4)	71 (6,1)
Hiperplasia de próstata	2 (3,3)	0 (0,0)	56 (93,3)	2 (3,3)	60 (5,2)
Lipomas	9 (16,7)	8 (14,8)	8 (14,8)	29 (53,7)	54 (4,7)
Septoplastia	0 (0,0)	10 (18,5)	18 (33,3)	26 (48,1)	54 (4,7)
Quiste de cuerdas	2 (11,1)	0 (0,0)	3 (16,7)	13 (72,2)	18 (1,6)
Cirugía plástica	7 (87,5)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (0,7)
Fimosis, ligadura de trompas	3 (60,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	5 (0,4)
Otros <sup>a</sup>	15 (75,0)	1 (5,0)	3 (15,0)	1 (5,0)	20 (1,7)
Total	289 (24,9)	248 (21,4)	245 (21,1)	378 (32,6)	1160 (100)

<sup>a</sup> Orejas en asa, nódulo eutiroideo

De los 1718 pacientes excluidos del estudio, 196 (11,4%) pertenecían al Hospital Xeral de Santiago de Compostela, 680 (39,6%) al Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, 296 (17,2%) al Hospital Clínico Universitario de Valladolid y 527 (30,7%) a los Hospitales de Galdakao y Basurto. Las causas de exclusión aparecen recogidas en la tabla C.

Tabla C. Distribución de los individuos excluidos por centro según la causa de exclusión

	Santiago		Barcelona		Valladolid		Galdakao		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Diagnostico endoscópico excluible	104	(53,1)	360	(52,9)	107	(36,1)	275	(52,2)	846	(49,8)
No ingresó por HDA	19	(9,7)	24	(3,5)	5	(1,7)	98	(18,6)	146	(8,6)
HDA sin diagnostico desde el ingreso hasta el alta	1	(0,5)	69	(10,1)	7	(2,4)	42	(8,0)	119	(7,0)
Antecedentes patológicos	1	(0,5)	55	(8,1)	21	(7,1)	10	(1,9)	87	(5,1)
Endoscopia a las 48h del ingreso	34	(17,3)	11	(1,6)	31	(10,5)	7	(1,3)	83	(4,9)
Rehúsa contestar la entrevista o no la realiza completamente	4	(2,0)	14	(2,1)	47	(15,9)	15	(2,8)	80	(4,7)
Rehúsa firmar el consentimiento informado			35	(5,1)	27	(9,1)	4	(0,8)	66	(3,9)
Otros motivos de exclusión	10	(5,1)	39	(5,7)	2	(0,7)	8	(1,5)	59	(3,5)
Alta de un hospital o acudió a un centro 15 días antes del ingreso	5	(2,6)	27	(4,0)	9	(3,0)	17	(3,2)	58	(3,4)
Ocurrido en fin de semana o en vacaciones			25	(3,7)	14	(4,7)	18	(3,4)	57	(3,4)
Residencia en el área de estudio inferior a 3 meses	4	(2,0)	31	(4,6)	3	(1,0)	1	(0,2)	39	(2,3)
Ingreso menor de 24h	1	(0,5)	2	(0,3)	16	(5,4)	19	(3,6)	38	(2,2)

## Anexos

Éxitus antes de entrevistarlos	2	(1,0)	1	(0,1)	7	(2,4)	4	(0,8)	14	(0,8)
Portadores de SNG o percutánea	8	(4,1)			3	(1,0)	2	(0,4)	13	(0,8)
Alteraciones psíquicas (demencia, desorientación...)			4	(0,6)	5	(1,7)	3	(0,6)	12	(0,7)
Estado grave			1	(0,1)	7	(2,4)			8	(0,5)
Vive en una residencia y no conoce los fármacos que toma			1	(0,1)	2	(0,7)	4	(0,8)	7	(0,4)
HDA intrahospitalarias					6	(2,0)			6	(0,4)
No ha sido posible la entrevista en los primeros 15 días	3	(1,5)			2	(0,7)	1	(0,2)	6	(0,4)
Ciego o sordo			3	(0,4)	1	(0,3)			4	(0,2)
Menor de 18 años	1	(0,5)			2	(0,7)			3	(0,2)
Analfabeto			1	(0,1)			1	(0,2)	2	(0,1)
Total	196	(100)	680	(100)	296	(100)	527	(100)	1699	(100)

Se seleccionaron para entrar a formar parte del modelo de análisis definitivo aquellas variables cuya significación estadística (p) fue menor de 0,05. Se recogen dichas variables en la tabla D.

Tabla D. Factores de riesgo de tipo ambiental que fueron considerados para la construcción del modelo de análisis definitivo. OR crudas con su intervalo de confianza al 95% y su grado de significación estadística p

Factor de riesgo	Tipo de factor de riesgo estudiado	OR cruda (IC95%)	p.valor
IMC	Sobrepeso vs. peso normal	0,69 (0,54-0,88)	0,003
Estudios	Años de estudio	1,04 (1,01-1,06)	0,006
	Cigarrillos al día (ex-fumadores=0)	1,01 (1,00-1,02)	0,029
Tabaco	Fumar vs. No fumador	1,27 (0,97-1,67)	0,088
	Consumo de Coca-Cola	1,54 (1,19-2,00)	0,001
Cafeína	Consumo de alcohol	1,01 (1,00-1,01)	0,002
	Elevado consumo de alcohol vs. no consumo	2,68 (1,54-4,67)	0,000
	Consumo de algún licor	1,34 (1,03-1,75)	0,029
Alcohol	Úlcera vs. nada	2,50 (1,76-3,57)	0,000
	Sangrado vs. nada	4,77 (3,36-6,78)	0,000
	Úlcera vs. nada o dispepsia	2,54 (1,81-3,57)	0,000
Antec. Personal más grave	Sangrado vs. nada o dispepsia	4,85 (3,47-6,78)	0,000
	Enfermedad del corazón	1,45 (1,13-1,87)	0,004
	Antecedentes familiares de sangrado a causa de una úlcera	1,76 (1,35-2,28)	0,000
Antec. Patológicos	<i>Helicobacter pilory</i> positivo vs. negativo o dudoso	2,77 (1,79-4,28)	0,000
Antec. Familiares	Otras fuentes de información vs. pacientes	1,98 (1,41-2,78)	0,000
H. Pilory	2 o más visitas vs. 1 visita	3,37 (2,32-4,91)	0,000
	Fiabilidad	0,93 (0,86-0,99)	0,027
Entrevista			

	Fiabilidad entre 5 y 7 vs. <5	0,53 (0,29-0,97)	0,041
	Fiabilidad $\geq 9$ vs. <5	0,48 (0,28-0,84)	0,010
	Más de 3 medicamentos vs. 3 o menos	1,77 (1,43-2,20)	0,000
	Exposición a AINE (M01A) y salicilatos	3,45 (2,74-4,33)	0,000
	Exposición a AINE (M01A)	3,63 (2,70-4,88)	0,000
	Exposición a inhibidores selectivos de la Cox-2	1,23 (0,31-4,92)	0,775
	Exposición a salicilatos	2,67 (2,05-3,47)	0,000
	Exposición a protectores gástricos (IBP+H2)	0,71 (0,51-0,96)	0,027
	Exposición a IBP	0,79 (0,56-1,11)	0,169
	Exposición a antihistamínicos H2	0,56 (0,31-1,01)	0,053
Medicamentos	Exposición a prostaglandinas	2,45 (0,35-17,47)	0,370
	Exposición a otros protectores	2,45 (0,15-39,26)	0,527
	Exposición a antiácidos	2,41 (1,56-3,72)	0,000
	Exposición a antiagregantes plaquetarios	1,65 (1,25-2,18)	0,000
	Exposición a antiagregantes plaquetarios (sin AAS)	1,77 (1,12-2,80)	0,014
	Exposición a antagonistas de la vitamina K	1,60 (1,03-2,48)	0,035
	Exposición a nitratos orgánicos	1,55 (0,88-2,74)	0,130
	Exposición a estatinas	0,96 (0,71-1,30)	0,802
	Exposición a corticoides	0,82 (0,52-1,27)	0,364

Se ajustó el modelo de regresión logística condicional multivariante y se identificaron los factores de riesgo asociados definitivamente con hemorragia digestiva alta. Los resultados de este análisis se recogen en las tablas E, F, G y H.

Tabla E. Factores de riesgo incluidos en el modelo estadístico relacionados con la hemorragia gastrointestinal considerando solo el polimorfismo C50T de COX-1

Factores	OR cruda (IC95%)	OR ajustada (IC95%)
Exposición a AINE <sup>a</sup>	3,45 (2,74-4,33)	5,30 (3,58-7,85)
Genotipo C/T o T/T vs. C/C	0,89 (0,59-1,35)	0,69 (0,39-1,22)
Úlcera vs. nada o dispepsia	2,54 (1,81-3,57)	2,83 (1,63-4,92)
Sangrado vs. nada o dispepsia	4,85 (3,47-6,78)	8,07 (4,53-14,36)
Exposición a antiagregantes plaquetarios (sin AAS)	1,77 (1,12-2,80)	5,18 (2,20-12,24)
Antecedentes familiares de sangrado a causa de una úlcera	1,76 (1,35-2,28)	1,80 (1,19-2,75)
Exposición a antiácidos	2,41 (1,56-3,72)	3,31 (1,59-6,88)
Consumo de alcohol	1,01 (1,00-1,01)	1,01 (1,00-1,02)
Exposición a antagonistas de la vitamina K	1,60 (1,03-2,48)	2,72 (1,34-5,52)
Exposición a protectores gástricos (IBP+H2)	0,71 (0,53-0,96)	0,40 (0,24-0,67)

<sup>a</sup> AINE del grupo M01A y salicilatos

Tabla F. Factores de riesgo incluidos en el modelo estadístico relacionados con la hemorragia gastrointestinal considerando solo el polimorfismo A-842G de COX-1

Factores	OR cruda (IC95%)	OR ajustada (IC95%)
Exposición a AINE <sup>a</sup>	3,45 (2,74-4,33)	5,96 (3,92-9,06)
Genotipo A/G o G/G vs. A/A	1,08 (0,70-1,65)	0,77 (0,41-1,45)
Úlcera vs. nada o dispepsia	2,54 (1,81-3,57)	3,11 (1,67-5,78)
Sangrado vs. nada o dispepsia	4,85 (3,47-6,78)	6,78 (3,67-12,53)
Exposición a antiagregantes plaquetarios (sin AAS)	1,77 (1,12-2,80)	5,68 (2,25-14,37)
Antecedentes familiares de sangrado a causa de una úlcera	1,76 (1,35-2,28)	1,72 (1,11-2,66)
Exposición a antiácidos	2,41 (1,56-3,72)	3,95 (1,89-8,25)
Consumo de alcohol	1,01 (1,00-1,01)	1,01 (1,00-1,02)
Exposición a protectores gástricos (IBP+H2)	0,71 (0,53-0,96)	0,44 (0,26-0,74)

<sup>a</sup> AINE del grupo M01A y salicilatos

Tabla G. Factores de riesgo incluidos en el modelo estadístico relacionados con la hemorragia gastrointestinal considerando solo el haplotipo C50T/A-842G de COX-1

Factores	OR cruda (IC95%)	OR ajustada (IC95%)
Exposición a AINE <sup>a</sup>	3,45 (2,74-4,33)	6,14 (3,97-9,49)
Haplotipo C/T-A/G o T/T-G/G vs. C/C-A/A	1,00 (0,67-1,51)	0,75 (0,39-1,44)
Úlcera vs. nada o dispepsia	2,54 (1,81-3,57)	3,03 (1,62-5,66)
Sangrado vs. nada o dispepsia	4,85 (3,47-6,78)	6,36 (3,41-11,88)
Exposición a antiagregantes plaquetarios (sin AAS)	1,77 (1,12-2,80)	7,45 (2,77-19,98)
Antecedentes familiares de sangrado a causa de una úlcera	1,76 (1,35-2,28)	1,71 (1,08-2,70)
Exposición a antiácidos	2,41 (1,56-3,72)	4,20 (1,94-9,07)
Consumo de alcohol	1,01 (1,00-1,01)	1,01 (1,00-1,02)
Exposición a antagonistas de la vitamina K	1,60 (1,03-2,48)	2,34 (1,13-4,86)
Exposición a protectores gástricos (IBP+H2)	0,71 (0,53-0,96)	0,44 (0,25-0,76)

<sup>a</sup> AINE del grupo M01A y salicilatos

Tabla H. Factores de riesgo incluidos en el modelo estadístico relacionados con la hemorragia gastrointestinal considerando solo el polimorfismo 4b/4a de eNOS

Factores	OR cruda (IC95%)	OR ajustada (IC95%)
Exposición a AINE <sup>a</sup>	3,45 (2,74-4,33)	5,19 (3,44-7,84)
Genotipo a/b o a/a vs. b/b o b/c	0,83 (0,33-2,07)	1,21 (0,80-1,82)
Úlcera vs. nada o dispepsia	2,54 (1,81-3,57)	2,60 (1,42-4,75)
Sangrado vs. nada o dispepsia	4,85 (3,47-6,78)	8,24 (4,58-14,82)
Exposición a antiagregantes plaquetarios (sin AAS)	1,77 (1,12-2,80)	3,33 (1,43-7,75)
Antecedentes familiares de sangrado a causa de una úlcera	1,76 (1,35-2,28)	1,75 (1,15-2,66)
Exposición a antiácidos	2,41 (1,56-3,72)	3,32 (1,63-6,76)
Consumo de alcohol	1,01 (1,00-1,01)	1,02 (1,01-1,02)
Exposición a antagonistas de la vitamina K	1,60 (1,03-2,48)	2,57 (1,27-5,20)
Exposición a protectores gástricos (IBP+H2)	0,71 (0,53-0,96)	0,38 (0,22-0,65)

<sup>a</sup> AINE del grupo M01A y salicilatos

## Anexo 11

Publicaciones relacionadas con el estudio





## Prevalence of CYP2C9 polymorphisms in the south of Europe

Paula Sánchez-Diz<sup>1</sup>, Ana Estany-Gestal<sup>2</sup>, Carmelo Aguirre<sup>3</sup>, Adoración Blanco<sup>4</sup>, Angel Carracedo<sup>1</sup>, Luisa Ibáñez<sup>5,6</sup>, Marianna Passiu<sup>7</sup>, Lisa Provezza<sup>8</sup>, Ricardo Ramos-Ruiz<sup>9</sup>, Borja Ruiz<sup>3</sup>, Inés Salado-Valdivieso<sup>10</sup>, Eladio A Velasco<sup>11</sup> and Adolfo Figueiras<sup>2,12</sup>

<sup>1</sup>Genomics Medicine Group, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela, CIBER for Rare Diseases (CIBERER), Santiago de Compostela, Spain; <sup>2</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain; <sup>3</sup>Unidad de Farmacovigilancia, Hospital de Galdakao-Usansolo, Bilbao, Spain; <sup>4</sup>Unit of Molecular Hematologic Genetics, Clinical Laboratories, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Catalan Institute of Pharmacology, Clinical Pharmacology Service, University Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Department of Pharmacology, Therapeutics and Toxicology, Autonomous University, Barcelona, Spain; <sup>7</sup>Department of Medicine and Public Health, Section of Pharmacology, University of Verona, Verona, Italy; <sup>8</sup>Department of Mother and Child, Section of Biology and Genetics, University of Verona, Verona, Italy; <sup>9</sup>Toril Martin Gallardo Genomics Unit, Science Park of Madrid, Madrid, Spain; <sup>10</sup>Cancer Genetics, Institute of Biology and Molecular Genetics (UVa-CSIC), Valladolid, Spain; <sup>11</sup>Instituto de Farmacoepidemiología, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain and <sup>12</sup>Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP)

### Correspondence:

Dr P Sánchez-Diz, Genomics Medicine Group, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela, c/San Francisco, s/n. 15782 Santiago de Compostela. A Coruña. Spain.  
 E-mail: paula.sanchez@usc.es

Received 9 March 2009; accepted 16 March 2009; published online 21 April 2009

CYP2C9 is a major liver enzyme responsible of the metabolism of many clinically important drugs. The presence of CYP2C9 genetic polymorphisms has been associated with marked interindividual variability in its catalytic activity that could result in drug toxicity. Here we present frequencies of the most common CYP2C9 coding variants CYP2C9\*2 (C430T) and CYP2C9\*3 (A1075C) in representative samples of four regions from Spain (Basque Country,  $n=358$ ; Catalonia,  $n=240$ ; Central Spain,  $n=190$  and Galicia,  $n=288$ ) and one northern Italian region, (Verona,  $n=164$ ), which range between 0.125 and 0.165 in the case of CYP2C9\*2 and between 0.071 and 0.085 for CYP2C9\*3. No significant differences between CYP2C9 allele frequencies were found comparing all the sampled populations. A more extensive comparative analysis using allele frequency data of populations widely spread over Europe was performed, showing significant differences in the CYP2C9\*2 allele frequencies distribution between some of the regions, being quite homogeneous in the case of CYP2C9\*3 variant. The results obtained show that above 40% of our samples carry a mutate allele, which can result in a poor metabolism of low therapeutic index drugs as oral anticoagulants (warfarin, acenocoumarol), oral antidiabetic drugs and some non-steroidal anti-inflammatory drugs. Our study constitutes both a large ( $n=1240$ ) and robust allele frequency database on CYP2C9 polymorphisms, which represents one of the most numerous CYP2C9\*2 and \*3 database existing to date.

*The Pharmacogenomics Journal* (2009) 9, 306–310; doi:10.1038/tpj.2009.16; published online 21 April 2009

**Keywords:** CYP2C9 polymorphism; CYP2C9 5'-flanking region; allele frequency; Spain; Italy

### Introduction

Families 1–3 of the Cytochrome P450 enzymes play a critical role in the oxidative metabolism of the majority of clinically used drugs. These enzymes display polymorphism and their prevalence varies among different populations.<sup>1–3</sup>

In particular, the polymorphic enzyme CYP2C9 is the most abundant of the CYP2C enzymes,<sup>4</sup> and it influences the metabolism of about 10–20% of therapeutically important drugs,<sup>5</sup> some with a narrow therapeutic index. A high number of genetic polymorphisms associated with wide interindividual variability in the hepatic metabolism of target drugs have been described in the regulatory and coding regions of CYP2C9 gene;<sup>6</sup> however, only two coding variants, CYP2C9\*2 (C430T) and CYP2C9\*3 (A1075C), with functional consequences are common. CYP2C9\*2 codes for a R144C substitution and CYP2C9\*3 reflects an I359L change in the amino-acid sequence.<sup>7</sup> It is thought that these variants are both associated with significant reductions in intrinsic clearance of a

variety of CYP2C9 substrates compared with the wild type, which can result in an increase of dose-dependent adverse drug reactions.<sup>8–10</sup> For this reason, the knowledge of the prevalence of these CYP2C9 variants is of fundamental relevance for effective drug therapy especially to prevent the adverse response to therapeutic agents.

Currently, some studies on CYP2C9 polymorphisms have been published, but most of them analyse a limited number of individuals from major population groups or large geographic areas.<sup>11–23</sup> Here we present a descriptive study of the prevalence of the most relevant CYP2C9 polymorphisms, CYP2C9\*1 (wild type), CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3, in population samples from both Spain (Basque Country, Catalonia, Central Spain and Galicia) and northern Italy (Verona) summing up a total of 1240 individuals. We also compared the allele frequencies on our population samples with those previously published for other European populations. On the other hand, various single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in the flanking region of the CYP2C9 gene,<sup>23</sup> which appear to influence CYP2C9 activity. However, the impact of these non-coding SNPs on CYP2C9 activity *in vivo* and in therapeutics still has to be evaluated in Caucasians. Furthermore, it is known that the genetic response could be related not only to individual SNPs but also to the combination of different SNPs in the same and other genes. So, we have analysed one of the most common 5'-flanking region polymorphisms: -1189C>T in the sample from Galicia, according to the methods described in Mas *et al.*<sup>11</sup> Our results indicate that in future studies, CYP2C9 haplotypes could be better predictors of pharmacologic response associated to CYP2C9 metabolized drugs.

## Results

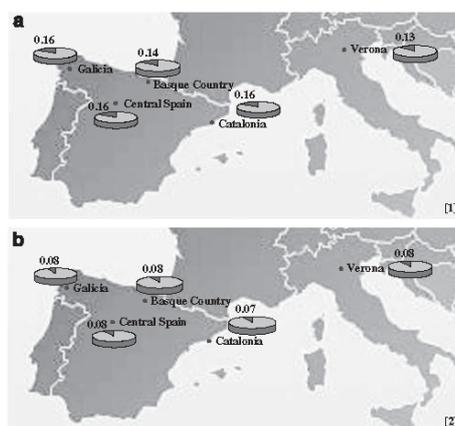
### Validation study

To validate the different methods used for genotyping, a set of 21 samples representing all different detected genotypes, and previously analysed by TaqMan system, were genotyped using single base extension (SBE) by SNaP-shot according to Mas *et al.*<sup>11</sup> Concordance was 100% between both methods.

### Allele, genotype and haplotype frequencies and Hardy–Weinberg equilibrium

No significant deviations from Hardy–Weinberg expectations were observed in any of the studied populations on both variants ( $0.0576 < P < 0.7921$  on CYP2C9\*2 and  $0.3304 < P < 1.000$  on CYP2C9\*3).

Figure 1 illustrates the CYP2C9 allele frequencies observed in all the analysed populations. The genotype frequencies are summarized in Table 1. In agreement to the published data obtained for other Caucasian populations (Table 2), our results show that CYP2C9\*2 allele is more common than CYP2C9\*3 in all the samples. We observed that the most frequent genotype is the wild type (\*1/\*1) followed by the heterozygous for CYP2C9\*2 and \*3 alleles with an altered function, respectively (Table 1).



**Figure 1** Frequency of the CYP2C9 \*2 (a) and \*3 (b) variants in the studied population samples.

The sample from Galicia was also typed for the 5'-flanking region polymorphism -1189C>T, and a frequency of 0.6 was obtained for the mutated allele, which was similar to that observed in related populations (~0.62 in Spaniards<sup>11</sup>).

We measured the linkage disequilibrium between pairs of SNPs and a very high value between 5'-1189C>T and C430T was obtained ( $D' = 0.9$ ) near to that estimated before by Morin *et al.*<sup>16</sup> On the contrary, the  $D'$  value between A1075C and both the others was lower ( $D' = \sim 0.5$ ).

Five different haplotypes including the three polymorphisms were inferred (Table 3), bearing in mind that those with a frequency below 0.001 were omitted. We observed that the most frequent four haplotypes were those which were previously detected.<sup>11,16</sup> No haplotype was determined by the combination of the three polymorphic sites.

### Population diversity

CYP2C9\*2 and \*3 allele frequencies were compared among the sampled populations and also among data previously published for 12 European populations scattered all over the continent from the United Kingdom,<sup>17</sup> Holland,<sup>18</sup> France,<sup>16</sup> Germany,<sup>19</sup> Hungary,<sup>20</sup> Italy,<sup>21</sup> Sweden,<sup>22</sup> Turkey,<sup>12</sup> Belgium,<sup>13</sup> Iran,<sup>14</sup> Spain<sup>11</sup> and the Europeans from the United States of America<sup>23</sup> (Table 4).

No significant differences were observed among our five samples in any of the CYP2C9 variants.

Although CYP2C9 allele frequency distributions seem to be quite uniform in European populations, looking at our samples, the CYP2C9\*2 frequency comparisons show slightly significant differences in both Catalonia and Galicia versus the United Kingdom ( $0.0159 \pm 0.0037$  and  $0.0197 \pm 0.0041$ , respectively) and Turkey ( $0.03395 \pm 0.0063$  and  $0.0318 \pm 0.0107$ , respectively), and between Galicia and Germany ( $0.0280 \pm 0.0063$ ). Significant differences were also



Table 1 Frequency of CYP2C9 genotypes in the study group (n=1240)

Genotype	CYP2C9*2	CYP2C9*3	Catalonia	Basque Country	Galicia	Central Spain	Total Spain <sup>a</sup>	Verona
CYP2C9*1/*1	C/C	A/A	0.608 (146)	0.600 (215)	0.583 (169)	0.558 (106)	0.591 (636)	0.604 (99)
CYP2C9*1/*2	C/T	A/A	0.213 (51)	0.237 (85)	0.234 (68)	0.258 (49)	0.235 (253)	0.213 (35)
CYP2C9*2/*2	T/T	A/A	0.046 (11)	0.017 (6)	0.021 (6)	0.021 (4)	0.025 (27)	0.018 (3)
CYP2C9*1/*3	C/C	A/C	0.096 (23)	0.123 (44)	0.107 (31)	0.131 (25)	0.114 (123)	0.159 (26)
CYP2C9*3/*3	C/C	C/C	0.008 (2)	0.006 (2)	0.007 (2)	0.010 (2)	0.008 (8)	0.006 (1)
CYP2C9*2/*3	C/T	A/C	0.029 (7)	0.017 (6)	0.041 (12)	0.021 (4)	0.027 (29)	0
Total			240	358	288	190	1076	164

<sup>a</sup>Resulting from grouping all the Spanish populations sampled for the study.

Table 2 Distribution of the CYP2C9\*2 and CYP2C9\*3 allele frequency in different European populations

Ethnicity	n	C	T (*2)	A	C (*3)	References
American (white)	325	0.851	0.149	0.929	0.071	<sup>23</sup>
British	561	0.894	0.106	0.947	0.053	<sup>17</sup>
Dutch	60	0.858	0.142	0.908	0.092	<sup>18</sup>
French	151	0.850	0.150	0.920	0.080	<sup>16</sup>
German	367	0.894	0.106	0.922	0.078	<sup>19</sup>
Hungarian	143	0.836	0.164	0.906	0.094	<sup>20</sup>
Italian	180	0.817	0.183	0.911	0.089	<sup>21</sup>
Verona	164	0.875	0.125	0.915	0.085	This study
Swedish	430	0.893	0.107	0.926	0.074	<sup>22</sup>
Turkish	499	0.894	0.106	0.900	0.100	<sup>12</sup>
Belgian	121	0.900	0.100	0.926	0.074	<sup>13</sup>
Iranian	160	0.890	0.110	0.903	0.097	<sup>14</sup>
Spanish	200	0.880	0.120	0.938	0.062	<sup>11</sup>
Spanish	1092	0.843	0.157	0.922	0.078	This study
Catalonia	243	0.835	0.165	0.929	0.071	This study
Basque Country	360	0.856	0.144	0.925	0.075	This study
Galicia	290	0.840	0.160	0.917	0.083	This study
Central Spain	199	0.842	0.158	0.917	0.083	This study

Table 3 CYP2C9 haplotypes found in Galicia population sample

	430 C>T	1075 A>C	-1189 C>T	FRQ
H1	C	A	T	0.5979
H2	C	A	C	0.1676
H3	T	A	C	0.1479
H4	T	A	T	0.0021
H5	C	C	C	0.0552

found between a sample from Italy and the United Kingdom (0.00965 ± 0.0028), Germany (0.01840 ± 0.0068), Sweden (0.01325 ± 0.0061) and Turkey (0.01485 ± 0.0039). In the CYP2C9\*3 allele frequency comparisons no significant differences were obtained between our samples and all the collected populations ( $P > 0.05$ ), being significant only between Turkey and the United Kingdom (0.00595 ± 0.0030).

Furthermore,  $-1189C > T/C430T/A1075C$  haplotype frequency comparisons were performed between Galicia and population samples from France<sup>16</sup> and Spain<sup>11</sup> and no significant differences were observed ( $P > 0.05$ ).

## Discussion

In this large study, we report allele and genotype frequency data on CYP2C9\*2 and \*3 altered variants in five different regions from southern Europe. The obtained data show that, as we presumed, in all the sampled regions the frequency of CYP2C9\*2 carriers is higher than the carriers of CYP2C9\*3, the later having a stronger reduction of the catalytic activity of the enzyme with respect to the wild type.<sup>10</sup>

The comparative analysis between our samples and other European populations shows that the frequency distribution of the CYP2C9\*2 was slightly heterogeneous, as significant differences were obtained between some of the regions, being quite homogenous in the case of \*3 allele.

The genotyping method based on a multiplex PCR and SBE reaction used in Galician sample covered two of the most important genetic variants that alter the CYP2C9 activity and also one SNP at position  $-1189C$  of the CYP2C9 promoter region. Using this method, samples could be processed in plates and the final genotypes could be obtained in a short period of time with a cost per genotype lower than that from conventional methods and other commercial assays. Thus, the SnapShot-based genotyping proved to be robust, accurate, rapid and cost effective, and the results were easy to interpret, which is relevant to facilitate the application of pharmacogenetic data into clinical practice to improve personal drug therapy.

Due to the high linkage disequilibrium observed between the 5'-flanking region SNPs and the two coding CYP2C9 SNPs, C430T and A1075C,<sup>24</sup> these CYP2C9 haplotypes detected in the population from Galicia could become useful in pharmacogenetic studies as predictors of the interindividual variability in drug response, not explained just by the presence of the coding polymorphisms. This observation also suggests that the pharmacogenetic response associated to CYP2C9 substrates should be evaluated in future studies using more newly described CYP2C9 SNPs of interest.

**Table 4** Exact test *P* values<sup>a</sup> between pairs of populations

	Italy <sup>21</sup>	Verona	Spain	Catalonia	Basque Country	Galicia
<b>CYP2C9*2</b>						
Verona	0.17750 ± 0.086					
Spain <sup>11</sup>	0.08920 ± 0.0092	0.87835 ± 0.0048				
Catalonia	0.71555 ± 0.0099	0.31925 ± 0.0160	0.22610 ± 0.0154			
Basque Country	0.26375 ± 0.0190	0.69760 ± 0.0173	0.44945 ± 0.0134	0.58155 ± 0.0182		
Galicia	0.59130 ± 0.0147	0.35545 ± 0.0141	0.14800 ± 0.0118	1.00000 ± 0.0000	0.60055 ± 0.0095	
Central Spain	0.49865 ± 0.0123	0.45710 ± 0.0123	0.26780 ± 0.0151	0.90165 ± 0.0044	0.70330 ± 0.0095	0.90235 ± 0.0026
<b>CYP2C9*3</b>						
Verona	1.00000 ± 0.000					
Spain <sup>11</sup>	0.33090 ± 0.009	0.41550 ± 0.013				
Catalonia	0.47125 ± 0.010	0.57470 ± 0.010	0.70460 ± 0.007			
Basque Country	0.60590 ± 0.008	0.72715 ± 0.012	0.60610 ± 0.011	0.87565 ± 0.005		
Galicia	0.86430 ± 0.004	1.00000 ± 0.000	0.38215 ± 0.014	0.62820 ± 0.009	0.78255 ± 0.007	
Central Spain	1.00000 ± 0.000	1.00000 ± 0.000	0.31680 ± 0.009	0.59850 ± 0.009	0.74605 ± 0.006	1.00000 ± 0.000

<sup>a</sup>Statistical significance from  $P \leq 0.05$ .

Interethnic differences in frequencies of *CYP2C9* variants might be responsible, at least in part, for the variation in drug disposition between main population groups.<sup>3</sup> Likewise, particular subpopulations with the same ethnicity could present differences in allele frequencies due to diverse causes. For that reason, it is really relevant to know the prevalence of *CYP2C9* polymorphisms in different populations, even those coming from the same ethnic group. Thus, the precise assessment of the allele frequencies could help in future pharmacogenetic studies to optimize therapy with *CYP2C9* substrates. However, a representative sample of the studied population, with a significant number of individuals and a clear definition of their origin, is required for the calculation of the allele frequencies.

Our study constitutes a large and robust allele frequency database on *CYP2C9* polymorphisms, including representative samples of well-defined regions from northern Spain and Italy, making up one of the most numerous *CYP2C9\*2* and *\*3* databases. We observed that above 40% of individuals of our sample are altered metabolizers of the *CYP2C9* substrates. This could be very relevant in the use of narrow therapeutic index drugs as oral anticoagulants (warfarin, acenocumarol), oral antidiabetic drugs and some non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

## Materials and methods

### Subjects and samples

The study group consisted of 1240 patients attended in preoperative for trivial surgery of not painful clinical processes in four clinical centres from different regions of Spain: 358 from Basque Country (north-central), 240 from Catalonia (northeast), 190 from Central Spain and 288 from Galicia (northwest), and one centre from Verona (164) in northern Italy (Figure 1). All the samples were gathered between 2003 and 2005 in the following hospitals: Hospital de Galdakao (Basque Country), Hospital Vall d'Hebron de

Barcelona (Catalonia), Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Central Spain), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (Galicia) and Azienda Ospedaliera di Verona (Verona). Patients were selected as control group from a previous pharmacogenetic multicentre study regarding the genetic predisposition to gastrointestinal haemorrhage after NSAIDs use, in which the five sanitary centres have participated. After giving their informed consent, only adult residents in the sanitary area of the participant hospitals, without precedents of neoplasia, cirrhosis or coagulopathies, were included in the study. These individuals were selected to be representative of the population belonging to the sanitary area corresponding to each hospital. The study was approved by the ethical clinic committee of all the hospitals involved in the study.

Each hospital used its own routine DNA extraction method.

### Genotyping

Two different methods were used to genotype the variants of the *CYP2C9* gene (*CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3*). (1) The samples from Galicia were genotyped through a multiplex SBE method performed by SNaPshot technology (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following the conditions described by Mas *et al.*<sup>11</sup> The first step consisted of a multiplex PCR which allows the amplification of the fragments including the variants C430T, A1075C and 5'-flanking region -1189C>T. Following that the purified PCR products are used in a multiplex SBE reaction where the detection primers<sup>11</sup> annealed adjacent to the SNP position. The allele detection was achieved using ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The GeneMapper ID v3.2 software (Applied Biosystems) was used for the allele assignment. (2) In the remaining population samples, the *CYP2C9* polymorphisms were detected by TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems) in a 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The



allele assignment was performed using the SDS 2.2.2 software (Applied Biosystems).

#### Statistical analysis

The SNPpass R package version 2.7<sup>25</sup> was used for the estimation of allele and haplotype frequencies and for assessing the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in each population and SNP separately.

Haplotypes were inferred from the information about SNPs by the use of a phase reconstruction method<sup>26</sup> and the expectation-maximization algorithm in the Arlequin ver 3.1 package.<sup>27</sup>

The linkage disequilibrium between each pair of SNPs (C430T, A1075C and 5' -1189C > T) was assessed using also the Arlequin ver 3.1 package<sup>27</sup> and expressed in terms of *D'*, only in the samples from Galicia. Population comparisons were performed by exact test of population differentiation implemented in the same software.<sup>27</sup>

#### Conflict of interest

All the authors declared no conflict of interest.

#### Acknowledgments

This study was supported by grants PI021512, PI021364, PI020661, PI021572 (Health Research Fund, Fondo de Investigación Sanitaria, Spain), SAF2002-04057 (Ministry of Health and Consumer Affairs, Spain), PGIDIT03PXIC20806PN (Xunta de Galicia, Spain) and 02/1572 (Basque Regional Authority, Spain). PSD is supported by the Isidro Parga Pondal program (Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica-INCITE (2006-2010) from Xunta de Galicia, Spain). The Diana Fundación Barrié-USC Research Program (Fundación Pedro Barrié de la Maza) has partially funded this study. We express our gratitude to Enrique Domínguez, Antía Romaní Fernández, María Jose López Otero, Alberto Ruano and Juan Miguel Barros Dios from the Santiago de Compostela University Clinical Teaching Hospital, and Elena Ballarín, Xavier Barroso, Cristina Rebordosa, Lourdes Vendrell and Soraya Martín from Hospital Vall d'Hebron of Barcelona. We are also grateful to María Brión and Angel Salgado Barreiro for their help and comments.

#### References

- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**: 342-349.
- Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000; **356**: 1667-1671.
- Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**: 1257-1270.
- Läpple F, von Richter O, Fromm MF, Richter T, Thon KP, Wissler H et al. Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 565-575.
- Kirchheiner J, Brockmöller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **77**: 1-16.
- Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW. Human cytochrome P450 allele nomenclature. Available from: URL: [http://www.cypalleles.ki.se/CYP\\_alleles/](http://www.cypalleles.ki.se/CYP_alleles/).
- Ingelman-Sundberg M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; **207**: 52-56.
- Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *J Am Med Assoc* 2002; **287**: 1690-1698.
- Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the *in-vitro* and human data. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 251-263.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gómez A, Rodríguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drugs therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007; **116**: 496-526.
- Mas S, Crescenti A, Vidal-Taboada JM, Bergeño S, Cuevillas F, Laso N et al. Simultaneous genotyping of CYP2C9\*2, \*3, 5' flanking region (C-1189T) polymorphisms in a Spanish population through a new minisequencing multiplex single-base extension analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; **61**: 635-641.
- Aynacioglu AS, Brockmöller J, Bauer S, Sachse C, Güzelpay P, Ongen Z et al. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999; **48**: 409-415.
- Allabi AC, Gala JL, Desager JP, Heusterspreute M, Horsmans Y. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *Br J Clin Pharmacol* 2003; **56**: 653-657.
- Llerena A, Dorado P, O'Kinwan F, Jepson R, Licinio J, Wong ML. Lower frequency of CYP2C9\*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *Pharmacogenomics* 2004; **4**: 403-406.
- Vianna-Jorge R, Perini JA, Rondinelli E, Suarez-Kurtz G. CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**: 18-26.
- Morin S, Bodin L, Loriot MA, Thijsen HH, Robert A, Strabach S et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**: 403-414.
- Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000; **96**: 1816-1819.
- Van der Weide J, Steijls LS, Van Weelden MJ, de Haan K. The effect genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 287-291.
- Ackermann E, Cascorbi J, Sachse C, Brockmöller J, Mroczkiewicz PM, Roots I. Frequencies and the allelic linkage of CYP2C9 mutations in a German population, and the detection of a C/T mutation in intron 2 [abstract]. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; **52**: A71.
- Ozawa S, Shoket B, McDaniel LP, Tang YM, Ambrosone CB, Kostic S et al. Analyses of bronchial bulky DNA adduct levels and CYP2C9, GSTP1 and NQO1 genotypes in a Hungarian study population with pulmonary diseases. *Carcinogenesis* 1999; **20**: 991-995.
- Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 775-778.
- Yassar Ü, Eliasson E, Dahl ML, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **254**: 628-631.
- Gaedigk A, Casley WL, Tyndale RF, Sellers EM, Jurima-Romet M, Leeder JS. Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; **79**: 841-847.
- Shintani M, Ieiri I, Inoue K, Mamiya K, Ninomiya H, Tashiro N et al. Genetic polymorphisms functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: In vitro and in vivo studies. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**: 175-182.
- González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X et al. SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; **23**: 644-645.
- Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003; **73**: 1162-1169.
- Excoffier L, Laval G, Schenneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; **1**: 47-50.



---

## Resumen presentado en las X Jornadas de Farmacovigilancia

### INFLUENCIA DE ALGUNOS POLIMORFISMOS GENETICOS EN LA HEMORRAGIA DIGESTIVA

Salado I<sup>1</sup>, Aguirre C<sup>2</sup>, Figueiras A<sup>3</sup>, Ibáñez L<sup>4</sup>, Durán M<sup>5</sup>, Ramos R<sup>6</sup>, Orbañanos L<sup>1</sup>, Carvajal A<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Farmacoepidemiología. Universidad de Valladolid. <sup>2</sup>Departamento de Farmacología. Universidad del País Vasco. <sup>3</sup>Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Santiago de Compostela. <sup>4</sup>Fundació Institut Català de Farmacologia. Universitat Autònoma de Barcelona. <sup>5</sup>Instituto de Biología Molecular y Genética del Cáncer. Universidad de Valladolid. <sup>6</sup>Unidad de Genómica. Fundación Parque Científico de Madrid.

**Introducción** Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) es uno de los grupos de fármacos más utilizados en nuestra población y con un riesgo elevado de producir hemorragias digestivas. Otros factores de riesgo han sido menos estudiados; la susceptibilidad individual debida a factores genéticos se ha asociado en algunos estudios con riesgo de hemorragia digestiva.

**Objetivos** i) Explorar la posible asociación entre polimorfismos funcionales en el gen de la COX (C50T y A-842G) y la hemorragia digestiva; ii) Explorar la posible asociación entre polimorfismos funcionales en el gen de la eNOS (a/b situado en el intrón 4) y la hemorragia digestiva; iii) Conocer la distribución de estos dos polimorfismos en población española.

**Método** Se ha llevado a cabo un estudio de casos y controles en cuatro hospitales. Se identificaron casos de hemorragia digestiva alta confirmados mediante endoscopia y controles de la misma población emparejados por edad, sexo y tiempo de atención. A todos los individuos del estudio se les realizó una entrevista y se les extrajo una muestra de sangre para estudios genéticos.

**Resultados** Se dispuso de muestras válidas de sangre de 369 casos y de 986 controles. El genotipo C/C del polimorfismo C50T de la COX-1 se encontró en 291 casos (89,5%) y 789 (89,4%) controles, el C/T en 34 casos (10,5%) y 93 controles (10,5%) y el genotipo T/T tan solo se encontró en un control (1,1%). El genotipo A/A del polimorfismo A-842G se encontró en 277 casos (89,3%) y 754 controles (91,1%), el A/G en 33 casos (10,6%) y 73 controles (8,8%) y el genotipo G/G solo se encontró en un control (1,1%). Tomando como genotipos de referencia los más frecuentes (el C/C para un polimorfismo C50T y el A/A para el A-842G), los valores crudos de las odds ratio fueron: para el genotipo C/T de la COX-1, 1,0 (IC95%, 0,7-1,5); para el genotipo A/G de la COX-1, 1,2 (IC95%, 0,8-1,9).

El genotipo a/a del polimorfismo 4a/4b de la eNOS se encontró en 6 casos (1,9%) y 25 controles (2,6%), el genotipo a/b se encontró en 121 casos (38,5%) y 339 controles (35,6%), el genotipo b/b se encontró en 185 casos (58,9%) y 585 controles (61,4%) y el genotipo b/c, que se encontró en 2 casos (0,6%) y 4 controles (0,4%). Los valores de las odds ratio para los genotipos de la eNOS, tomando como referencia el genotipo más frecuente (b/b), fueron: para el genotipo a/a de la eNOS, 0,7 (IC95%, 0,3-1,8); a/b de la eNOS 1,1 (IC95%, 0,9-1,5) y b/c de la eNOS 1,5 (IC95%, 0,3-8,7).

**Conclusiones** No se ha encontrado asociación entre las variantes polimórficas estudiadas y la hemorragia gastrointestinal alta.



---

## Artículo no publicado

### Variantes del CYP2C9 y riesgo de HGI asociado al consumo de AINE: un estudio de casos y controles.

*Figueiras A, Estany-Gestal A, Aguirre C, Ruiz B, Vidal X, Carvajal A, Salado I, Rodella L, Moretti U, Ibáñez L and in behalf of the EMPHOGEN group. (In press)*

#### RESUMEN

**Antecedentes.** Las hemorragias gastrointestinales (HGI) asociadas al consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINE), son una de las reacciones adversas a medicamentos más frecuentes y graves. Se han descrito variantes de metabolización lenta en la enzima CYP2C9, que metaboliza la mayoría de los AINE, que podrían incrementar el riesgo de HGI en los consumidores de AINE.

**Objetivo.** Determinar si la presencia de las variantes *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* en la enzima que metaboliza los AINE, podría incrementar el riesgo de HGI en los individuos expuestos a estos fármacos.

**Diseño.** Estudio multicéntrico de casos y controles incidentes.

**Marco.** Cinco hospitales del suroeste de Europa.

**Pacientes.** Los casos fueron individuos con diagnóstico de HGI y los controles, sujetos candidatos para cirugía de procesos clínicos no dolorosos.

**Medidas.** Incremento del riesgo de HGI en individuos portadores de *CYP2C9\*2* y/o *CYP2C9\*3* considerando a su vez, la dosis de AINE consumida.

**Resultados.** Se estudiaron 581 casos y 1358 controles; el 40,2% de los casos y el 59,1% de los controles eran portadores de alguna de las variantes estudiadas. El análisis por alelos mostró que los OR de HGI en portadores de la *CYP2C9\*2* y de la variante salvaje, eran muy similares [7,12 (2,34-21,73) y 6,87 (4,02-11,72), respectivamente] y muy inferiores al hallado para la variante *CYP2C9\*3* [OR=19,85 (7,42-53,07)], a partir de 0,25 dosis medias diarias definidas de AINE metabolizado por el CYP2C9. Agrupando a los individuos en portadores y no portadores de la variante *CYP2C9\*3* en sus genotipos, se obtuvieron unos OR de 18,89 (5,79-61,64) para los portadores de la variante y de 7,05 (3,95-12,58) para los no portadores.

**Limitaciones.** El tamaño de la muestra no fue suficiente para realizar el análisis por genotipos.

**Conclusiones.** Los portadores de la variante *CYP2C9\*3* tienen un predisposición genética a sufrir HGI asociadas al consumo de AINE. Esta predisposición tiene grandes implicaciones clínicas ya que el 14% de la población de origen europeo es portadora de esta variante.

## 1 Introduction

Interindividual variation in response to drugs is an important problem in clinical practice, which could partially account for treatment failure or the appearance of certain adverse drug reactions (ADRs). It is now known that this variability has an important genetic component<sup>1</sup>. The toll that such variation takes in terms of individual suffering, high healthcare costs and even lives, is being increasingly recognised<sup>2</sup>. Gastrointestinal haemorrhages (GIHs) are one of the most frequent and potentially most severe ADRs<sup>3,4</sup> and, despite the recent decline in incidence, the associated mortality rate remains constant<sup>5</sup>.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are responsible for over half of all hospital admissions due to GIH<sup>6</sup>. This ADR has a very important idiosyncratic component, which might be accounted for by the existence of functional variants in the gene that codes for enzyme CYP2C9 (the principal metaboliser of NSAIDs)<sup>7,8</sup>. Two of these variants have estimated prevalences in the European population of around 14% (*CYP2C9\*2*) and 8% (*CYP2C9\*3*)<sup>9,10</sup>. *In vitro* studies indicate that the *CYP2C9\*3* variant is less than 5% as efficient as the wild-type enzyme, while *CYP2C9\*2* shows about 12% of wild-type activity<sup>11,12</sup>.

Six studies have been published with the stated objective of assessing the role of *CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3* variants in increased risk of suffering from NSAID-related GIHs<sup>13-18</sup>. Yet, the results obtained are not consistent, and some of these studies also display methodological limitations in terms of both design and analysis<sup>19,20</sup>. Accordingly, our aim here is to report the results of the first full case-control study to ascertain whether the presence of the *CYP2C9\*2* and/or *CYP2C9\*3* variants might modify the risk of suffering from GIHs among NSAID users, taking the dosage consumed into account.

## 2 Methods

### 2.1 Study settings and design

An incident case-control study was conducted at hospitals in four cities in northern Spain (Santiago de Compostela, Valladolid, Galdakao and Barcelona) and one in northern Italy (Verona). Patients were recruited from January 2004 to November 2007. These hospitals had a combined catchment population of 1,570,687. This study was approved by the respective ethics committees of the participant hospitals.

### 2.2 Definition of cases and controls

A *case* (patient with GIH) was defined as any patient over 18 years of age admitted to hospital with primary diagnosis of gastric ulcer, acute lesions of the gastric mucosa or erosive duodenitis, confirmed by endoscopy or surgery. In addition, the case definition was also deemed to include any subject who, albeit not presenting with clinical symptomatology of GIH, had undergone an endoscopy within 48 hours of admission in which signs of recent bleeding were in evidence.

The hospital *controls* (patients without GIH) were recruited in a manner that ensured that they came from the same source population as did the cases<sup>21</sup>. Three controls were selected for each case, matched by sex, age ( $\pm$  5 years), hospital and point in time ( $\pm$ 3 months, to avoid the influence of the seasonal component of NSAID use). To ensure that controls were recruited independently of their NSAIDs exposure status, they were selected from among patients in preoperative units who were about to undergo minor surgery for non-painful clinical processes not associated with NSAIDs use, such as cataracts, inguinal/umbilical hernias or adenomas of the prostate, among others. The exclusion criteria considered are set out more fully in Figure 1.

All participants were informed as to the nature of the study, with signature of the informed consent form being an indispensable requirement for inclusion in the study

### 2.3 Clinical data collection

A comprehensive interview was administered by trained health staff. The following four strategies were pursued to obtain the most complete pharmacological anamnesis possible: (1) subjects were asked direct questions about any drugs (including over-the-counter drugs) that they had taken during the preceding two months, including daily dose and indication; (2) they were also asked about a series of frequent symptoms for which NSAIDs are indicated, and the treatments used to mitigate such symptoms; (3) to facilitate recognition of NSAIDs, subjects were shown a catalogue with prompt-cards of the most popular NSAIDs in each of the study areas. Furthermore, family members were allowed to be present during and participate in the interview, though only data confirmed by the patients were recorded; and (4) in any case where subjects failed to remember any of the data requested, the interview was repeated at a later date or they were contacted by telephone.

To evaluate NSAID exposure, the following index dates were set: for cases, date of onset of the first signs or symptoms of the disease; and for controls, date of interview. In line with many other studies which analyse the relationship between exposure to NSAIDs and risk of GIH, we considered an aetiological 7-day window, dating from the index date<sup>18,22</sup>.

### 2.4 *Helicobacter pylori* determination

Presence of anti-*H.pylori* IgG antibodies was determined in the plasma of participants, using a commercial ELISA kit (Trinity Biotech Captia, Co. Wicklaw, Ireland) in accordance with the manufacturer's instructions. The choice of this method was based on the fact that serological techniques used for *H. Pylori* determination are not affected by the presence of GIH or use of proton pump inhibitors (PPIs)<sup>23</sup>. Since the main drawback of serological determination of *Helicobacter pylori* is the possibility of false positives due to old infections, during the interview subjects were asked if they had been treated for *Helicobacter pylori* infection.

### 2.5 SNP genotyping

Two different methods were used for genotyping participants' *CYP2C9\*2* and *CYP2C9\*3* variants: (1) in the case of samples from Santiago de

Compostela, a multiplex single base extending (SBE) reaction was performed, using SNaPshot technology (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in accordance with the conditions described by Mas *et al.*<sup>24</sup>; and (2) in the case of subjects from the four remaining populations, these SNPs were detected, using TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems) with a PCR 7900HT in real time (Applied Biosystems). Allelic detection was performed using the SDS 2.2.2 software programme (Applied Biosystems). Concordance between the two methods was 100%<sup>9</sup>. All determinations were masked.

## 2.6 Definition of variables

NSAIDs metabolised by enzyme CYP2C9 were deemed to be any NSAID that relied on this enzyme for at least 50% of its biotransformation (NSAIDmC9). Accordingly, we considered celecoxib, diclofenac, ibuprofen, naproxen, aceclofenac, indomethacin, lornoxicam and piroxicam<sup>25</sup>. These drugs were quantified by calculating the mean defined daily dose (DDD) consumed in the week preceding the index date. The DDD is equivalent to the average daily dose of a drug used for its main indication via a given route of administration<sup>26</sup>.

To evaluate a possible dose-response effect, three models were considered for three different cut off points (DDDs of 0.25, 0.50 and 0.75), taking into account the mean DDD consumed in the week preceding the index date: (1) NSAIDmC9 non-users; (2) NSAIDmC9 users of the respective DDD cut-off point or less; and (3) NSAIDmC9 users of more than the respective DDD cut off point.

Acetylsalicylic acid was deemed to be an antiplatelet agent in case where indication was antiplatelet or the daily dose was less than 0.125 grams.

The variable personal history of gastrointestinal disorders, was divided into three categories: 1) none or dyspepsia, 2) ulcer, or 3) bleeding, and was created from each patient's history of ulcer and bleeding. A variable, denominated "data-source", was created on the basis of the identity of the person who answered the questionnaire, i.e., patient or family member/caregiver. Interview reliability, as perceived by the interviewer, was also assessed on a scale of 0 to 10. For statistical analysis purposes, this variable was categorised into quartiles.

## 2.7 Statistical analysis

Possible bias in the selection of controls was evaluated by reference assessment of the Hardy-Weinberg equilibrium in both variants<sup>27,28</sup>. Adjusted odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (95% CIs) were estimated using a generalised linear mixed model (GLMM) for dependent binomial-type variables (case or control)<sup>29,30</sup>. This approach has three advantages over conditional logistic regression, in that it enables: (i) the multicentre nature of the study to be taken into account when the models are being developed; (ii) advantage to be taken of information on strata (each case and its matched control) containing only cases or controls; and, likewise, (iii) advantage to be taken of information on strata in which all members have identical outcome values<sup>30</sup>.

In the construction of the models, three types of strata were considered in order to establish the effect on individuals. These were: level 1,

patients; level 2, cases and matched controls; and level 3, hospitals. The *lmer* function was used for estimation of the models<sup>30</sup>. The third model was constructed to obtain the risk associated with alleles but did not converge with the GLMM. Hence, as the variability observed in the strata was so low that it could be deemed negligible, generalised estimating equations (GEE) were used<sup>31</sup>.

We also calculated the combined effects of the sum of the separate effects of genetic variants and NSAIDs as a measure of additive interaction (S, (CI 95%)). S has been shown to be the most reliable measure of additive interaction when adjusting for confounding<sup>32</sup>.

A sensitivity analysis was also performed to assess: (1) possible stratification, by eliminating all subjects who were not of European origin from the analysis; and (2) the influence of different dosage levels, by using the NSAIDmC9 daily defined dose cut-off points of 0.50 and 0.75.

### **2.8 Role of the funding source**

The funding sources of the study were the Health Research Fund (*Fondo de Investigación Sanitaria*) and the Ministry of Health & Consumer Affairs, Spain; the Galician Regional Authority (*Xunta de Galicia*) and the Basque Regional Authority, Spain. The acquisition of the data in the Italian hospital, was supported by Pfizer. The laboratories Novartis, Pfizer and Dr. Esteve supported partially the contracts of the monitors.

The founding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis or interpretation of the data; preparation, review or approval of the manuscript. The translation to the English was compensated with this sources.

## **3 Results**

### **3.1 Clinical characteristics of the case-control study participants**

Of the 2750 subjects eligible to be cases and the 1572 controls initially selected, a total of 581 cases and 1358 controls finally participated in the study. Figure 1 shows a flow chart with the exclusion criteria, along with the number of cases and controls excluded. Table 1 shows the demographical and clinical characteristics of cases and controls: after matching, there were no differences between cases and controls in terms of age or sex distribution;

over 70% of cases and controls were males; and mean age was around 63 years. All variables included in Table 1 were considered for adjustment in the construction of the multivariate models.



## Glosario de términos



**Alelo** (*Allele*). Cada una de las formas en que puede presentarse un gen en un determinado locus.

**Cromosoma** (*Chromosome*). Estructura filamentosa autorreplicativa constituida por cromatina.

**Desequilibrio de ligamiento** (*Linkage disequilibrium*). Asociación preferencial entre alelos concretos de dos loci distintos que están en ligamiento en el mismo cromosoma.

**Exón** (*Exon*). Fragmento de un RNA mensajero que sobrevive al proceso de ensamblaje para formar parte del RNA mensajero maduro. Los exones conforman tanto la región codificante como las regiones transcritas no traducidas que flanquean la región codificante.

**Farmacogenética** (*Pharmacogenetics*). Estudio de la variación interindividual -determinada genéticamente- en el metabolismo y respuesta a los fármacos.

**Fenotipo** (*Phenotype*). Propiedades observables de un organismo, fruto de la interacción entre su genotipo y el ambiente en que éste se expresa.

**Gen** (Gene). Unidad de herencia que ocupa una posición concreta en el genoma (locus) y está constituido por una secuencia de DNA que codifica un RNA funcional.

**Genoma** (*Genome*). Complemento cromosómico básico que contiene toda la información genética del individuo.

**Genotipo** (*Genotype*). Conjunto de los alelos de un individuo en uno, varios o todos sus loci.

**Haplotipo** (*Haplotype*). Combinación, en un individuo concreto, de los alelos de varios genes que están en ligamiento en una región cromosómica específica.

**Heterocigoto (heterocigótico)** (*Heterozygote*). Célula o individuo diploide con alelos diferentes en uno o más loci de cromosomas homólogos.

**Homocigoto (homocigótico)** (*Homozygote*). Célula o individuo que tiene alelos idénticos en uno o más loci de cromosomas homólogos.

**Intrón** (*Intron*). Fragmento de un RNA mensajero que se pierde durante el proceso de ensamblaje y no está presente en el RNA mensajero maduro, por lo que no es codificante.

**Ley de Hardy-Weinberg** (*Hardy-Weinberg Law*). Exposición en términos matemáticos del principio de que las frecuencias genotípicas permanecen constantes en una población grande en condiciones de panmixia, siempre que no haya mutación, selección ni migración. En genética humana se utiliza para calcular las frecuencias alélicas a partir de la prevalencia de una enfermedad.

**Ligamiento** (*Linkage*). Tendencia de dos o más genes a heredarse juntos en una proporción mayor a la explicada por el principio de distribución independiente, debido a su localización en el mismo cromosoma.

**Locus (plural Loci)** (*Locus (loci)*). Posición que ocupa un gen en el genoma.

**Mutación** (*Mutation*). Cualquier modificación introducida en una secuencia nucleotídica que es estable (permanece tras la replicación del DNA).

**Nucleotido** (*Nucleotide*). Molécula constituida por una base nitrogenada, una pentosa y un grupo de ácido fosfórico. Es la unidad básica de la que se compone un ácido nucleico.

**Panmixia** (*Panmixia*). Sistema de apareamiento en el que la elección de pareja se realiza azar.

**Poligénico** (*Polygenic*). Rasgo fenotípico o enfermedad causado por la interacción de varios genes.

**Polimorfismo** (*Polymorphism*). Locus genético que está presente en dos o más alelos distintos, de forma que el alelo más raro tiene una frecuencia mayor o igual a 1% (0,01) en la población general. Un polimorfismo puede ser transitorio (las frecuencias alélicas tienden a cambiar debido a una ventaja selectiva) o estable (las frecuencias alélicas permanecen constantes durante muchas generaciones).

**RNA mensajero (mRNA)** (*Messenger RNA (mRNA)*). Molécula de RNA que es el resultado de la transcripción de una secuencia de DNA. El RNA mensajero madura en el núcleo y es exportado al citoplasma para ser traducido en proteína.

**Seudogén** (*Pseudogene*). Gene inactivo (no produce un producto proteico) cuya secuencia tiene un alto grado de homología con otro gen funcional que está en un locus distinto. Un seudogén procesado es una copia de otro gen pero que carece de intrones, tiene una pequeña cadena de poliadeninas y está flanqueado por repeticiones cortas; se piensa que proviene de la integración en el genoma de RNA maduro retro-transcrito. Un seudogén no procesados (o tradicional) surge por duplicación de un gen y posterior acumulación de mutaciones inactivantes, y suele estar cerca del gen funcional del que se originó.

**Silvestre** (*Wild-type*). El fenotipo o el alelo que se encuentra con mayor frecuencia en la naturaleza, y que por tanto se designa arbitrariamente como "normal"

**Sonda** (*Probe*). Término utilizado en biología molecular para designar un ácido nucleico monocatenario unido a algún tipo de marcador (radioactivo, fluorescente, enzimático), que se emplea para detectar una secuencia de DNA o RNA específica mediante técnicas de hibridación.

**VNTR** (*VNTR*). Acrónimo inglés de "Variable number of tandem repeats". Locus cuyos alelos difieren por tener un número variable de repeticiones en tándem. Son muy polimórficos, por lo que se utilizan como marcadores en estudios de ligamiento y en la determinación de identidad en medicina legal.