UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas

**ANÁLISE FARMACOGENÔMICA DE PACIENTES SUBMETIDOS À DUPLA
ANTIAGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.**

André Ducati Luchessi

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

Co-orientador:

Prof. Cat. Angel Carracedo

São Paulo, 2011

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Luchessi, André Ducati

L936a Análise farmacogenômica de pacientes submetidos à dupla
antiagregação plaquetária / André Ducati Luchessi. – São
Paulo, 2011.
102p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

Co-orientador : Carracedo, Angel

1. Análise clínica : Medicina 2. Genoma : Biologia Molecular
3. Sistema cardiovascular : Farmacodinâmica I. T. II. Hirata,
Mario Hiroyuki, orientador. III. Carracedo, Angel, co-orientador.

616.0756-9 CDD

**ANÁLISE FARMACOGENÔMICA DE PACIENTES SUBMETIDOS À DUPLA
ANTIAGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.**

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/Presidente

Prof. Dr.
1ª. Examinador(a)

Prof. Dr.
2ª. Examinador(a)

Prof. Dr.
3ª. Examinador(a)

Prof. Dr.
4ª. Examinador(a)

São Paulo, 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

A minha esposa, Vivian Nogueira Silbiger, pelo amor, respeito e compreensão, que foram fundamentais para a realização deste trabalho e que me incentivam, a cada dia, na busca por nossos sonhos e realizações.

AGRADECIMENTOS

*A Deus, por sempre colocar pessoas especiais
na minha vida e guiar meu caminho.*

Ao meu orientador e amigo, Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, pela oportunidade de desenvolver este projeto e por sua orientação, que foi muito além dos estudos científicos da minha tese. Certamente aprendemos muito um com outro e, hoje, agradeço pela paciência que teve comigo. Como um pai, realmente me ensinou a crescer enquanto pesquisador e pessoa. Muito obrigado.

À Profa. Tit. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pelo apoio durante a vida acadêmica e pelas críticas e sugestões no desenvolvimento deste projeto. Agradeço também pelo carinho e pela amizade aqui construída.

À Cristina Moreno Fajardo, técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF/USP, que, além do excelente apoio técnico, sempre nos relembra do amor de Deus para com seus filhos.

À Profa. Dra. Elvira Guerra, que compartilhou a amizade, o carinho e os sábios conselhos durante minha trajetória. Os momentos vividos em *Oxford* estão guardados para sempre no meu coração.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP). Em especial ao meu amigo e colaborador Lídio Neto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas dessa mesma instituição, em nome de sua chefe, Profa. Tit. Marina Baquerizo Martinez

À Profa. Tit. Primavera Borelli, coordenadora do programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Al Prof. Catedrático Ángel María Carracedo, que además de abrir las puertas de su laboratorio desde mi iniciación científica, siempre me ha incentivado y ha creído en mi carrera profesional. Gracias también por la estancia de movilidad en el extranjero en la Universidad de Santiago de Compostela, oportunidades éstas que contribuyeron mucho al desarrollo de mi proyecto y a mi crecimiento científico y personal.

Al Prof. Catedrático Manuel Lopes Rivasulla, por la estancia en su laboratorio de toxicología del Instituto de Ciencias Forense Luiz Concheiro, Santiago de Compostela España, una oportunidad que aportó mucho a mi tesis doctoral.

A los investigadores y amigos del Instituto de Ciencias Forense Luiz Concheiro, por toda la amable hospitalidad con la que me recibieron, en especial a mis amigos Dr. Oscar Quintela y Dra. Marta Concheiro, que tanto me ayudaron con mi aprendizaje en el área de química analítica.

A los investigadores del Centro Nacional de Genotipado (CeGen) España, Dra. María Brion, Bea Sobriño e Inés Quintela, que, además de toda la ayuda técnica y científica para el desarrollo de la tesis, fueron siempre muy amables y amigas.

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo, em nome da sua diretora, Profa. Dra. Amanda G. M. R. Sousa, pelo acesso à instituição e pela confiança.

Aos médicos e pesquisadores Dr. Marcelo Sampaio, Dr. Luis Fernando Leite Tanajura, Dra Danielle da Silva Peixoto Marcelino, Dra Simone Sorkin Arazi, Hui Tzu Lin Wang, Juliana Germano e Adriana Regina Garófalo, colaboradores do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo, pela dedicação na seleção de pacientes a serem por mim analisados e pelos cuidados a eles prestados.

Aos pacientes que contribuíram anonimamente para este estudo, sem os quais este trabalho não teria sido construído, meus sinceros agradecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida (Proc. 142884/2009-0) entre outubro de 2010 e agosto de 2011.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão dos recursos financeiros através do projeto de pesquisa aprovado sob o número: 09/10862-4.

Aos meus pais, Wladimir Luchessi e Maria Cristina Ducati Luchessi, aos meus irmãos, Augusto Ducati Luchessi e Júlio César Ducati Luchessi, e a minha cunhada, Tavane David Cambiaghi, por sempre estarem presentes em todos os momentos, me apoiando e incentivando, independente de onde eu esteja.

A minha pequena sobrinha, Sophie, pelos momentos de alegria e descontração no corre-corre do dia-a-dia.

Ao amor, minha amiga, minha companheira de trabalho, minha pesquisadora favorita, minha esposa, Vivian Nogueira Silbiger. Não há palavras que possam expressar minha gratidão a ela, que prestou o apoio fundamental para a execução deste projeto e é a peça essencial da minha vida.

RESUMO

LUCHESSI, A.D. **ANÁLISE FARMACOGENÔMICA DE PACIENTES SUBMETIDOS À DUPLA ANTIAGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**. 2011. 120 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O presente estudo avaliou o perfil farmacogenômico de 338 pacientes, sob terapia antiagregante. Os pacientes foram submetidos a tratamento prévio com AAS (100mg/dia) e clopidogrel (75mg/dia) por no mínimo cinco dias antes da angioplastia coronária. Os indivíduos com resposta considerada indesejada <30% de inibição de PRU (do inglês, *P2RY12 Reaction Unit*) para clopidogrel e >550 ARU (do inglês, *Aspirin Reaction Unit*), foram considerados como não respondedores. As concentrações plasmáticas dos antiagregantes foram determinadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa do tipo triploquadrupolo (LC-MS/MS). A taxa da inibição da agregação plaquetária foi medida utilizando-se o sistema *VerifyNow*[®]. A expressão gênica global das células totais do sangue periférico foi avaliada pela tecnologia de microarranjos de DNA *Human Exon ST 1.0 Array*. Características genotípicas dos pacientes também foram avaliadas pelo sistema *Sequenom*[®]. Assim, foi possível obter como resultados a identificação de 64% e 10% para pacientes não respondedores ao clopidogrel e AAS respectivamente, sendo que para o primeiro foi possível identificar a associação desta não resposta a variáveis clínicas como diabetes ($p = 0,003$), hipertensão ($p = 0,011$) e hábito de fumar ($p = 0,041$) e sexo ($p = 0,022$) e idade dos pacientes ($p = 0,004$) em relação à resposta ao AAS. O método de quantificação simultânea do clopidogrel, seu metabólito majoritário e do AS (metabólito do AAS), apresentou limites de quantificação entre de 2 a 500 ng/mL, 2 a 2000 ng/mL e de 20 a 2000 ng/mL, respectivamente. O estudo de associação encontrou uma relação significativa da presença dos SNPs presentes nos genes *CYP5A1* (rs2299890) e *CYP2C19* (rs4244285 e rs3758580), com a variação na resposta ao clopidogrel, obtendo um valor de p corrigido pelo teste de permutação inferior a 0,001. Como também, uma fraca associação da variação na resposta do AAS com o SNP rs9605030 do gene *COMT* ($p = 0,009$). Os resultados do microarranjos relacionaram a resposta terapêutica ao clopidogrel com os genes *CA2*, *MKRN1*, *ABCC3* e *MBP* seguido dos genes *NFIA* e *IGF1R* para a resposta ao AAS. Concluindo que o estudo farmacogenômico apresentou todo o seu potencial para relacionar variáveis como resposta, concentração farmacológica plasmática, SNPs e expressão global de RNAm, possibilitando assim compreender melhor a variação no tratamento antiagregante.

Palavra chave: Farmacogenômica, Clopidogrel, AAS, *VerifyNow*[®], SNP, LC-MS/MS, e Microarranjos

ABSTRACT

LUCHESSI, A.D. **PHARMACOGENOMICS ANALYSIS OF PATIENTS UNDERGOING DOUBLE PLATELET ANTIAGREGATION**. 2011. 120 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

This study investigated the pharmacogenomics profile of 338 patients under antiplatelet therapy. Patients undergoing pretreatment with ASA (100 mg/day) and clopidogrel (75mg/day) for at least five days prior to coronary angioplasty. Individuals with response <30% of PRU (*P2RY12* reaction unit) were considering non responder for clopidogrel and >550 of ARU (aspirin reaction unit), were considered as non responders for ASA. Plasma concentrations of the antiagregation drugs were determined by liquid chromatography followed mass spectrometry of triple quadrupole detection (LC-MS/MS). The rate of inhibition of platelet aggregation was measured using the VerifyNow[®] system. The global gene expression of total cells in blood was assessed by DNA microarray technology Human Exon 1.0 ST Array. Genotypic characteristics of the patients were also evaluated by the Sequenom[®] system. Thus it was possible to obtain results such as identification of 64% and 10% for patients non responders to clopidogrel and aspirin respectively, and for the first could identify the association of this response to variables such as diabetes ($p = 0.003$), hypertension ($p = 0.011$) and smoking ($p = 0.041$) for clopidogrel and sex and age in relation to response to ASA ($p = 0.022$ and $p = 0.004$, respectively). The method of simultaneous quantification of clopidogrel and its major metabolite of AS (metabolite of ASA), had quantification limits between 200 to 500 ng/mL 2000-2000 ng/mL and 20 to 2000 ng/mL, respectively. The association study found a significant grating presence of SNPs present in genes *CYP5A1* (rs2299890) and *CYP2C19* (rs4244285 and rs3758580), with the variation in the response to clopidogrel, obtaining a corrected p value by permutation test below 0.001. As well, a weak association of variation in the response of ASA with the SNP rs9605030 of the gene *COMT* ($p = 0.009$). The results of microarray related therapeutic response to clopidogrel with genes *CA2*, *MKRN1*, *ABCC3* and *MBP* followed by *NFIA* and *IGF1R* genes for response to ASA. Concluding that the pharmacogenomics study showed its potential to relate variables such as response, plasma drug concentration, SNPs and global expression of mRNA, thus enabling better understand the variation in antiplatelet treatment.

Keyword: Pharmacogenomics, clopidogrel, ASA, VerifyNow[®], SNP, LC-MS/MS, and Microarrays

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1.	Representação da ativação da agregação plaquetária.....	06
Figura 2.	Diagrama do desequilíbrio de ligação entre os blocos haplotípicos do gene <i>CYP5A1</i>	31
Figura 3.	Diagrama do desequilíbrio de ligação entre os blocos haplotípicos do gene <i>CYP2C19</i>	32
Figura 4.	Diagrama do desequilíbrio de ligação entre os blocos haplotípicos do gene <i>COMT</i>	35
Figura 5.	Representação da análise de componentes principais, gerados com a lista de genes identificados como diferentemente expressos em relação à resposta do AAS, subdividido em quartil.....	39
Figura 6.	Representação da análise de componentes principais, gerados com a lista de genes identificados como diferentemente expressos em relação à resposta do clopidogrel, subdividido em quartil.....	39
Figura 7.	Representação da rede de relacionamento entre os genes encontrados na análise de expressão diferencial de RNAm utilizando no microarranjo de DNA em resposta ao clopidogrel.....	41
Figura 8.	Representação da rede de relacionamento entre os genes encontrados na análise de expressão diferencial de mRNA utilizando no microarranjo de DNA em resposta ao AAS.....	42
Figura 9.	Comparação entre os valores de FC dos resultados do microarranjo de DNA (barras em azul) e da PCR em tempo real (barras em amarelo).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características clínicas dos pacientes subdivididos em relação à resposta aos antiagregantes.....	23
Tabela 2.	Parâmetros estabelecidos após desenvolvimento metodológico para o equipamento nos Modo de ionização, transição do monitoramento de reações múltiplas, voltagem do cone e energia de colisão selecionada para o CLO, MCLO, AS e os padrões internos, 6-MSA e DIA-d ₅	25
Tabela 3.	Imprecisão, precisão, eficiência da extração, eficiência do processo e efeito matriz para o CLO, MCLO e AS.....	26
Tabela 4.	Estabilidade do CLO, MCLO e AS em três diferentes condições de armazenamento.....	26
Tabela 5.	Concentrações plasmática de AS e resposta à inibição da agregação plaquetária categorizado de acordo com o tempo desde a última administração de AAS.....	27
Tabela 6.	Concentrações e respostas à inibição da agregação plaquetária categorizado de acordo com o tempo desde a última administração de clopidogrel.....	27
Tabela 7.	Associação dos SNPs com a resposta ao clopidogrel com o teste de Qui-quadrado.....	28
Tabela 8.	Associação dos blocos haplotípicos com a resposta ao clopidogrel.....	29
Tabela 9.	Teste de permutação para a correção dos valores de p para as associações de SNPs e Blocos haplotípicos.....	29
Tabela 10.	Resultados da análise de regressão logística utilizando como variável dependente a resposta ao clopidogrel nos distintos modelos de herança, alélica e haplotípica para os SNPs estudados.....	33
Tabela 11.	Associação dos SNPs com a resposta ao AAS com o teste de Qui-quadrado.....	34
Tabela 12.	Associação dos blocos haplotípicos com a resposta ao AAS.....	34
Tabela 13.	Regressão logística utilizando como variável dependente a resposta ao AAS, no modelo de herança codominate para os SNPs estudados.....	36
Tabela 14.	Dados demográficos e características clínicas dos pacientes subdivididos por quartil de resposta ao AAS.....	37

Tabela 15.	Dados demográficos e características clínicas dos pacientes subdivididos por quartil de resposta ao clopidogrel.....	38
Tabela 16.	Resultados de análise de correlação entre os resultados da PCR em tempo real e do microarranjo de DNA.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Porcentagem
% RDP	Porcentagem relativa do desvio padrão
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual
®	Marca registrada
3 F/D	Três ciclos de congelamento e descongelamento
3'UTR	3' Região não traduzida
5'UTR	5' Região não traduzida
6-MAS	Ácido 6-metoxisalicílico
A	Adenina
AAS	Ácido Acetilsalicílico
ABCC3	<i>ATP bind casset C3</i>
ACE	Enzima conversora de angiotensina
ACTP	Angioplastia coronária transluminal percutânea
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARU	<i>AAS reaction unit</i>
AS	Ácido salicílico
ATP	Adenosina trifosfato
B	Coefficiente linear
C	Citosina
CA2	Anidrase carbônica 2
CAPRIE	<i>Clopidogrel vs ASA in Patients at Risk of Ischaemic Events</i>
Cat	Catedrático
CCL8	Ligante de quimiocina 8 (C-C motif)
CD86	Antígeno <i>CD86</i>
CeGen	Centro Nacional de Genotipagem da Espanha
CENPE	Proteína E de centrômero
CEP	Células endoteliais progenitoras circulantes
<i>CES1</i>	Carboxilesterase 1
CEU	<i>Utah residents with ancestry from northern and western Europe</i>
CLO	Clopidogrel
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
<i>COMT</i>	<i>Catechol-O-methyltransferase</i>
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
<i>COX-1</i>	Ciclooxigenase 1
CQ	Controle de qualidade
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CURE	<i>Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial</i>
CV	Coefficiente de variação

CYP	Citocromo P450
<i>CYP2B6</i>	Citocromo P450 2B6
<i>CYP2C19</i>	Citocromo P450 2C19
<i>CYP2C9</i>	Citocromo P450 2C9
<i>CYP3A4</i>	Citocromo P450 3A4
<i>CYP3A5</i>	Citocromo P450 3A5
<i>CYP5A1</i>	Citocromo P450 5a1
DCV	Doença cardiovascular
DIA-d ₅	Diazepam-d ₅
DNA	Ácido desoxirribonucleotídeo
DNAc	Ácido desoxirribonucleotídeo complementar
Dr	Doutor
Dra	Doutora
DUSP1	<i>Dual specificity phosphatase 1</i>
E.E	Eficiência de extração
E.M	Efeito matriz
E.P	Eficiência do processo
<i>ENG</i>	<i>Endoglin</i>
<i>eNOS</i>	Óxido nítrico sintase
Euro Heart Survey ACS	<i>Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes</i>
FAP	Fator agregante das plaquetas
FAR	Frequência do alelo raro
FC	<i>Fold-change</i>
FvW	Fator de von Willebrand
G	Guanina
<i>GP1b</i>	Glicoproteína 1b
<i>GPIIb/IIIa</i>	Glicoproteína IIb/IIIa
GRACE	<i>Global Registry of Acute Coronary Events</i>
h	Horas
H. familiar	Histórico familiar
HapMap	<i>International HAPMAP Project</i>
<i>HNF1A</i>	Fator nuclear de hepatócitos 1 ^a
<i>HNF4A</i>	Fator nuclear de hepatócitos 4 ^a
<i>HSPA1A</i>	Proteína 1A de choque térmico
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IAM sem ST	Infarto agudo do miocárdio sem elevação do seguimento ST
IAM-ST	Infarto agudo do miocárdio com elevação do seguimento ST
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
IC95	Intervalo de confiança 95%
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
<i>IGF1</i>	Fator semelhante à insulina 1
<i>IGF1R</i>	Receptor do fator semelhante à insulina 1
<i>IK</i>	Citosina <i>IK</i>
<i>IL1A</i>	Interleucina 1 ^a

<i>IL2RA</i>	Interleucina 2RA
IMC	Índice de Massa Corporal
<i>IRS</i>	Substrato do receptor de insulina
<i>IRS2</i>	Substrato do receptor de insulina 2
ISE	Ionização por spray de elétrons
IVT	Transcrição <i>in vitro</i>
LC-MS/MS	Espectrometria de massa do tipo triploquadrupolo
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LID	Limite inferior de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LQ	Limite de quantificação
LTA	Agregometria por transmitância de luz
<i>MBP</i>	Proteína básica de mielina
MCLO	Metabólito do clopidogrel
min	Minutos
<i>MIP-1b</i>	Ligante de quimiocina 4 (C-C motif)
miRNA	<i>microRNA</i>
<i>MKRN1</i>	<i>Makorin ring finger protein 1</i>
mL	Mililitro
MODY 1	<i>Maturity onset diabetes of the young</i>
n	Número
Não Resp	Não respondedor
<i>NEK2</i>	<i>NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2</i>
<i>NFIA</i>	<i>Nuclear factor I/A</i>
<i>NFkB</i>	Fator de necrose k beta
ng	Nanogramas
ng/mL	Nanogramas por mililitro
nm	Nanômetro
<i>NOP56</i>	<i>Ribonucleoprotein homolog</i>
°C	Graus Celsius
OR	<i>Odds Ratio</i>
<i>p</i>	Valor de <i>p</i>
<i>P2RY12</i>	<i>Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12</i>
<i>PAFAH1B2</i>	<i>Platelet-activating factor Acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 2</i>
PgG2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>
PgH2	<i>Prostaglandin E synthase 2</i>
PgI2	<i>Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)</i>
PI	Padrão interno
<i>PON</i>	Paraoxonase
Prof	Professor
Profa	Professora
PRU	<i>P2RY12 reation unit</i>
<i>PTGS1</i>	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>

Q1	Quartil 1
Q2	Quartil 2
Q3	Quartil 3
Q4	Quartil 4
r	Coefficiente de correlação
r^2	Coefficiente de determinação
RANTES	Ligante de quimiocina 5 (C-C motif)
RLDL	Recepto de LDL
RNA	Ácido ribonucléico
RNAc	Ácido ribonucléico complementar
RNAm	RNA mensageiro
RPFA	<i>Rapid Platelet Function Assay</i>
RSF1	<i>Remodeling and spacing factor 1</i>
SCA	Síndrome coronariana aguda
SLC11A1	<i>Solute carrier family 11</i>
SLC18A2	<i>Solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2</i>
SNP23	Synaptosomal-associated protein 23
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphs</i>
SNX17	<i>Sorting nexin 17</i>
SST	Supradesnível do segmento ST
SULT1A1	<i>Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
T1	Tercil 1
T2	Tercil 2
T3	Tercil 3
TFDP2	Fator de transcrição Dp-2
Tit	Titular
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
tPA	Plasminogênio tecidual
TR	Tempo de retenção
TUDA	Tempo desde ultima dose de AAS
TUDC	Tempo desde ultima dose de clopidogrel
UBE2F	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2F</i>
UGT	<i>UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase</i>
UGT2B1	<i>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B1</i>
UGT2B7	<i>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7</i>
USC	Universidade de Santiago de Compostela
USP	Universidade de São Paulo
V	Voltagem
VASP-P	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation</i>
WTCCC	<i>Wellcome Trust Case Control Consortium</i>
YRU	<i>Yoruba in Ibadan Nigeria,</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 ATIVIDADE DE HEMOSTÁTICA DAS PLAQUETAS.....	02
1.2 CONDUTA TERAPEUTICA DO IAM.....	03
1.3. MEDICAMENTOS ANTIAGREGANTES.....	04
1.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DA RESPOSTA FARMACOLÓGICA DOS ANTIAGREGANTES PLAQUETÁRIOS.....	07
1.5. FARMACOGENÓMICA DOS ANTIAGREGANTES PLAQUETÁRIOS.....	08
2. OBJETIVO GERAL.....	12
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODO.....	13
3.1.CASUÍSTICA.....	13
3.2. AMOSTRA BIOLÓGICA.....	14
3.3. DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA A INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	14
3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DOS ANTIAGREGANTES E METABÓLITOS.....	15
3.5. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	17
3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	18
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. RESPOSTA A INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	22
4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS E SEUS METABÓLITOS EM PLASMA.....	24
4.3. POLIMORFISMO DOS GENES ENVOVIDOS NA FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO CLOPIDOGREL E AAS.....	28
4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	36
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

Estudo epidemiológico realizado no Pronto Socorro do Instituto Dante Pazzanese (IDPC) revelou que, no ano de 2003, 860 pacientes foram admitidos no hospital com dor torácica sugestiva de síndrome coronariana aguda (SCA) (SILVA et al., 2006). A SCA engloba um grupo de entidades que incluem infarto agudo do miocárdio (IAM) com supradesnível do segmento ST (SST), IAM sem SST e angina instável. Essas manifestações são causas comuns de atendimentos e de admissões nos departamentos de emergências, assim como causas de morbidade e de mortalidade no mundo. Dentro deste contexto, o Ministério da Saúde do Brasil relatam, em 2004, que houve 86.791 casos de óbitos por IAM e que corresponderam à aproximadamente 10% das internações do Sistema Único de Saúde (SUS) (<http://www.datasus.gov.br>). Estes dados demonstram a importante implicação do IAM à saúde pública e nos gastos sanitários gerados para o seu diagnóstico e tratamento.

A SCA esta intimamente associada ao processo cronicamente desenvolvido, a aterosclerose, que está relacionada ao depósito de lipídios na intima das artérias (GLASS; WITZTUM, 2001; LIBBY et al., 2010). Esta por sua vez, trata-se de uma doença multigênica e multifatorial, que pode envolver algumas centenas de genes e fatores ambientais (NABEL, 2003). Considerada uma doença fibroproliferativa com implicações inflamatórias em resposta a agressões por agentes infecciosos, fatores hemodinâmicos, mediadores plasmáticos, e mais significativamente por citocinas. Sendo uma manifestação sistêmica todas as artérias podem ser acometidas, com grau de lesão variável, clinicamente silenciosa ou com manifestações bastante graves. Portanto, a SCA como também sua principal entidade fisiopatologia o IAM, mostra-se sob o ponto de vista epidemiológico e de saúde pública de grande importância indiscutível.

Outra manifestação também clinicamente importante é o aneurisma, que podem acometer varias regiões do organismo, sendo as mais importantes a aórtica e a cerebral. Cerca de 76% das manifestações agudas sob a forma de trombozes coronárias fatais são precipitadas pela instabilização das placas ateroscleróticas levando a sua ruptura , em consequência da lesão do núcleo necrótico e da fina cápsula fibrótica, que rompe e causa à trombose devido a imediata ação das plaquetas (FALK, 2004).

As plaquetas participam ativamente em todas as fases da aterogênese. Inativas circulam na forma discóide e, sua ativação modifica o formato e estimula a agregação plaquetária. As consequências clínicas da ativação e agregação plaquetária intravascular são bem conhecidas: óbito, IAM e arritmias cardíacas (SCHWARTZ, R. et al., 2011). Dessa forma, medicamentos que

têm propriedade de inibir a ativação da agregação plaquetária têm sido utilizados na prevenção, no tratamento de complicações tromboembólicas e na progressão da aterosclerose (LOPES, 2011).

1.1 ATIVIDADE HEMOSTÁTICA DAS PLAQUETAS

As atividades fisiológicas das plaquetas são determinadas pela sua ação hemostática, que se inicia com adesão, agregação, ativação e formação do agregado. As células endoteliais fisiologicamente têm atividade antiplaquetária, anticoagulante e propriedades fibrinolíticas. No entanto ao sofrer lesão ou mesmo ativação, rapidamente exercem função pró-coagulantes. O equilíbrio entre atividade antitrombótica e pró-trombótica endotelial determina a formação, propagação ou dissociação do trombo (TOTANI; EVANGELISTA, 2010).

As células endoteliais lesadas estimulam as glicoproteínas da membrana plaquetária, que se ligam ao colágeno subendotelial mediado pelo Fator de von Willebrand (FvW), componente do complexo molecular denominado Fator VII da coagulação (FIRBAS et al., 2010). Inicialmente no processo da agregação, as plaquetas unem entre si, formando uma massa com características reversíveis e a seguir perdem sua forma individual (metamorfose viscosa), liberando grânulos intra plaquetários, que ocasionam formação de trombos irreversíveis. Desta forma alteram morfológicamente de esférica para discóide com emissão de pseudópodes, entrelaçando-se entre si. Nesta etapa torna indispensável à presença de fibrinogênio ligado às glicoproteínas da membrana plaquetária. A mudança morfológica das plaquetas possibilita a saída de substâncias contidas nos grânulos plaquetários, através de canalículos, propiciando a denominada reação de liberação e outras reações biológicas (TOTANI; EVANGELISTA, 2010).

A mobilização do cálcio é inibida pelo AMP cíclico formado nas membranas plaquetárias. A adenilciclase transforma o ATP em AMP cíclico e sua interação com o cálcio intracelular responde pela modulação da agregação plaquetária. A membrana plaquetária possui receptores alfa 2 adrenérgicos e receptores de adenosina difosfato (ADP). O contato da adrenalina com esses receptores inibe a adenilciclase, reduz a concentração de AMP cíclico, aumenta a mobilização do cálcio e, conseqüentemente, permite a agregação plaquetária (NOE et al., 2010). O ADP, de acordo com a sua concentração, estimula também receptores específicos da membrana plaquetária, expondo ligações para o fibrinogênio que participa efetivamente, por essa via, na agregação plaquetária.

Outras duas vias podem atuar na agregação das plaquetas. A via dependente da síntese de tromboxano ou do ácido aracdônico e a via do Fator agregante das plaquetas (FAP). Na via síntese

do tromboxano, sob a ação da fosfolipase A2, os fosfolípedes da membrana celular liberam o ácido aracdônico que por ação da cicloxigenase é transformado em endoperóxidos. Os endoperóxidos cíclicos (PgG2, PgH2), na membrana plaquetária dão origem ao tromboxano A2 e na membranas das células endoteliais originam a prostaciclina (PgI2). O tromboxano é o mais potente agente agregante e vasoconstritor com uma vida média de apenas 30 segundos. A prostaciclina é um agente antiagregante, vasodilatador e com grande importância biológica como antiagregante. Exerce efeitos via ativação da adenilciclase, aumenta a concentração do AMP cíclico e, consequentemente, reduz a agregação plaquetária (NAKAHATA, 2008). A via dependente do FAP atua por meio de ativação da trombina e tem a propriedade de agregar as plaquetas, inclusive quanto as vias ADP e ácido aracdônico estão inibidas. Sua ativação depende do íon cálcio e sua inativação depende do AMP cíclico induzido pela prostaciclina (NAKAHATA, 2008).

Vários defeitos hereditários de agregação plaquetária têm sido descritos, dentre os quais se destacam: a doença de depósito na qual não há reação de liberação, a deficiência hereditária de grânulos densos, a síndrome das plaquetas cinzentas, a deficiência hereditária de cicloxigenase ou tromboxano-sintetase e nos defeitos hereditários da mobilização de cálcio, todas colaborando para a deficiência da agregação plaquetária (CATTANEO, 2003).

1.2. CONDUTA TERAPEUTICA DO IAM

A conduta terapêutica para o IAM passou por profundas mudanças nos últimos anos. Para a restauração do fluxo sanguíneo interrompido, podem ser consideradas basicamente duas estratégias: a primeira, denominada tratamento farmacológico, tendo como base a utilização de antiagregantes plaquetários, como o ácido acetilsalicílico (AAS), tienopiridinas (ticlopidina e clopidogrel) e inibidores dos receptores GPIIb/IIIa; anticoagulantes orais; heparina; nitratos; beta-bloqueadores; magnésio; bloqueadores dos canais de cálcio; inibidores da enzima conversora de angiotensina; inibidores dos receptores de angiotensina; e recentemente, as vastatinas (sinvastatina e atorvastatina) que estão sendo utilizadas por reduzirem a taxa de mortalidade por IAM (CANNON et al., 2004). A segunda estratégia, denominada de reperfusão, pode ser medicamentosa com a utilização de agentes fibrinolíticos, como a estreptoquinase e fator ativador do plasminogênio tecidual (tPA), ou realizada através de procedimentos de angioplastia coronária transluminal percutânea (ACTP), que por sua vez se subdivide em outros quatro tipos: primária, realizada como procedimento de emergência logo após o diagnóstico de IAM; de salvamento, procedimento realizado após falha da terapia fibrinolítica; eletiva, procedimento realizado após

avaliação clínica do resultado do exame de cateterismo coronário; e facilitada, procedimento realizado utilizando concomitantemente regime farmacológico de reperfusão (GELFAND; CANNON, 2007).

Keeley e colaboradores (2003) publicaram uma extensa revisão de estudos que compararam a intervenção por ACTP primária com a terapia fibrinolítica para o tratamento de IAM-SST. Os autores observaram que a ACTP primária apresentou melhores resultados quando foram considerados os índices de morte em curto prazo (KEELEY, et al., 2003). Entretanto, o estudo de Goldstein e Wiel (2005), aborda que a realização dos dois procedimentos em conjunto, representa uma boa estratégia terapêutica, principalmente no tratamento de pacientes com relato de dor em tempo inferior a duas horas (GOLDSTEIN; WIEL, 2005).

O estudo clínico ADMIRAL (*Abciximab before Direct angioplasty and stenting in Myocardial Infarction Regarding Acute and Long-term follow-up*) demonstrou que a utilização de abciximab, um inibidor do receptor GPIIb/IIIa, juntamente com ACTP primária em pacientes com IAM-ST, causa resultados favoráveis quando consideramos a redução do risco absoluto para eventos clínicos graves em seguimentos de 30 dias a 3 anos (MONTALESCOT, et al., 2005). Em relação às evidências para o uso do AAS, os estudos GRACE (*Global Registry of Acute Coronary Events*) e Euro Heart Survey ACS (*Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes*) revelaram que existe uma importante variação da sua utilização na clínica, quando apresenta a frequência da falha na administração superior aos demonstrados para a sua intolerância (COMMITTEE, 1996), sendo 13% para administração de dose de carga e 11,5% para pacientes com IAM sem ST, respectivamente (BUDAJ, 2003).

Os estudos CAPRIE (*Clopidogrel vs ASA in Patients at Risk of Ischaemic Events*) e CURE (*Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial*) revelaram que o tratamento com clopidogrel apresentou uma maior eficácia do que com AAS para o IAM sem ST (COMMITTEE, 1996; YUSUF et al., 2001). No entanto, Geisler e Gawaz (2007) evidenciam um número significativo de pacientes com resistência ao clopidogrel associado ao aumento de eventos clínicos, desta forma, demonstrando a importância de se criar novos protocolos de pesquisa para pacientes resistente a ação dos antiagregantes (GEISLER ; GAWAZ, 2007).

1.3. MEDICAMENTOS ANTIAGREGANTES

Devido ao papel central das plaquetas no desenvolvimento da SCA, a utilização de terapia farmacológica, que podem atuar em varias vias da cascata de ativação plaquetária, se torna uma

ferramenta crucial no manejo clínico destes pacientes (CANNON et al., 2004). Assim, destacam-se três importantes alvos terapêuticos: o primeiro visa à diminuição da formação de tromboxano A2, com a utilização de AAS; o segundo atua na inibição do receptor P2RY12 com a utilização de antagonistas como o bissulfato de clopidogrel; e ainda com a inibição direta da agregação plaquetária com a utilização de anticorpos frente ao receptor de membrana plaquetária GPIIb/IIIa (Figura 1) (SANGKUHL et al., 2010).

O AAS, reduz a ativação plaquetária pela acetilação irreversível da enzima cicloxigenase 1 (COX-1), e assim, reduzindo a quantidade de tromboxano A2 produzidos pelas plaquetas. A inibição da COX-1 é rápida, saturável em doses baixas (isto é, independente da dose), irreversível, e permanente para a vida da plaqueta, uma vez que falta a maquinaria biossintética para sintetizar novas proteínas (HANKEY; EIKELBOOM, 2006). Após uma dose única 325 mg de AAS, a atividade plaquetária da COX-1 se recupera em cerca de 10% por dia devido a nova formação de plaquetas (BURCH et al., 1978). Dose baixa de AAS (aproximadamente, cerca de 30 mg) suprime a formação de tromboxano B2 (um metabólito estável de tromboxano A2) em pelo menos 95% dentro de cerca de 5 dias, e este nível de inibição é mantida a longo da administração (PATRIGNANI et al., 1982).

A ticlopidina foi à primeira tienopiridina utilizada como antagonista específico do receptor P2RY12, a ser testada em ensaios clínicos randomizados para a prevenção de eventos trombóticos arteriais. Embora a ticlopidina reduz a incidência de eventos vasculares em pacientes de risco, infelizmente, este medicamento apresenta algumas desvantagens significativas como a incidência relativamente alta de efeitos tóxicos, que pode ser fatal em alguns casos, o início tardio da ação, e uma alta variabilidade interindividual na resposta. O clopidogrel já é uma tienopiridina de segunda geração, com resultados superiores a ticlopidina, apresentando uma eficaz antitrombótica e menos tóxica do que a ticlopidina (CATTANEO, 2006).

No entanto, o clopidogrel não está completamente livre de falhas como efeitos tóxicos graves, embora ocorra com muito menos frequência do que com ticlopidina, e a alta variabilidade na sua resposta (HOSHINO et al., 2009). O clopidogrel é um pró-farmaco que necessita ser metabolizado através das enzimas do citocromo P450 (CYP) principalmente as CYP2C19 e no fígado para gerar seu metabólito ativo que atua de forma irreversível no receptor P2RY12 (SANGKUHL et al., 2010). Por outro lado, outra enzima hepática denominada carboxilesterase 1 (CES1) é capaz de metabolizar aproximadamente 85% de todo clopidogrel absorvido pelas células do intestino, gerando o metabólito inativo do clopidogrel. Esta via sendo a maior responsável pela eliminação deste fármaco (SANGKUHL et al., 2010).

Figura 1. Representação da ativação da agregação plaquetária. 1, ativação plaquetária mediada pela ligação do fator de von Willebrand com o receptor $GP1b$; 2, Agregação entre duas plaquetas através da ligação do fibrinogênio com o receptor $GPIIb/IIIa$; 3, Ativação da agregação plaquetária através da ação do tromboxano A_2 no seu receptor; 4, Ativação da agregação plaquetária através da ação do ADP ao receptor $P2RY_{12}$; 5, Ação da inibição da agregação plaquetária através do clopidogrel como antagonista do receptor $P2RY_{12}$; e 6, Ação da inibição da agregação plaquetária através do AAS como inibidor da $COX-1$. Adaptado de Borgdorff e colaboradores (BORGDORFF et al., 2006).

1.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DA RESPOSTA FARMACOLÓGICA DOS ANTIAGREGANTES PLAQUETÁRIOS

Atualmente, existem várias técnicas que podem ser utilizados para avaliar a função plaquetária ou melhor dizendo, determinar a taxa de inibição da ativação plaquetária mediada pelos fármacos antiagregante clopidogrel e AAS. O teste padrão atual para avaliação da função das plaquetas é agregometria por transmissão da luz (LTA), que mede a agregação plaquetária em resposta a um agonista específico adicionado em amostras de plasma rico em plaquetas, como por exemplo, o ácido araquidônico em resposta ao AAS; ADP para testar a resposta ao clopidogrel ou até mesmo trombina para avaliar a condição global das plaquetas ativadas independentemente da inibição farmacológica (MAHLA et al., 2009)

Apesar do LTA ser considerado como método padrão, ele tem várias limitações, incluindo a sua necessidade de técnicos qualificados devido ao seu procedimento laborioso e a necessidade de utiliza alto volume de amostra. Além disso, LTA pode estar sujeita a diversas variáveis metodológicas, resultando em uma baixa reprodutibilidade. Dentre as variáveis metodológicas pode ser destacada a grande variação na concentração do agonista utilizado, e a natureza do anti-coagulante para a obtenção do plasma rico em plaquetas (citrato ou hirudina) (LORDKIPANIDZÉ et al., 2007).

Outro método preconizado é a técnica de citometria de fluxo que também pode ser utilizado para testar a capacidade da resposta a fármacos antiagregantes plaquetário. Alguns destes ensaios, por exemplo, a avaliação vasodilatador estimulada fosforilação proteína (VASP-P) para testar clopidogrel induzida por efeitos sobre a inibição do *P2RY12*, podem ser altamente específicos para uma determinada via de sinalização. No entanto, este ensaio também demanda de um intenso trabalho laboratorial, requerendo pessoal experiente, e de alto custo (CUISSET et al., 2010).

As limitações técnicas associadas à LTA e avaliações de citometria de fluxo tem conduzir ao desenvolvimento de vários novos testes de função plaquetária. Muitos destes testes são ensaios rápidos que podem ser realizadas ao lado do paciente, sem a necessidade de grande experiência laboratorial. Um destes ensaios é o denominado *VerifyNow*[®], que determina a taxa a inibição farmacológicas das das plaquetas em amostras de sangue total, utilizando um agonista apropriado, dentro de um sistema fechado através de cartuchos individuais, tornando seu uso fácil e rápido (MALININ et al., 2007).

O cartucho dos testes *VerifyNow*[®] contém uma preparação liofilizada de partículas revestidas de fibrinogênio humano, agonista das plaquetas (ácido araquidônico ou ADP), tampão e conservante. Quando as plaquetas são expostas às micropartículas revestidas de fibrinogênio, a aglutinação ocorre em proporção ao número de plaquetas que têm seus receptores disponíveis. A mistura de sangue total anticoagulado com citrato é adicionada ao cartucho, e a aglutinação entre as plaquetas ativadas e as micropartículas revestidas é monitorada e gravada. Os resultados do sistema *VerifyNow*[®] são expressos em unidades de reação P2Y₁₂ (PRU) para a resposta ao clopidogrel e em unidade de reação a AAS (ARU) para o AAS. O instrumento *VerifyNow*[®] é um sistema turbidimétrico de detecção óptica, que mede a agregação plaquetária induzida como um aumento na transmissão da luz derivado da aglutinação das micropartículas com o fibrinogênio. Um controle de qualidade eletrônico, bem como testes de controle positivo e negativo são fornecidos pelo fabricante *Accumetrics*[®] (FONTANA et al., 2008; MALININ et al., 2007; NIELSEN et al., 2008).

1.5. FARMACOGENÓMICA DOS ANTIAGREGANTES PLAQUETÁRIOS

A variação na resposta ao tratamento farmacológico, pode estar associada à variabilidade inter-individual relacionada a fatores como: sexo, idade, hábito de fumar, alimentação, interação com outros medicamentos e perfil genético. Estes fatores podem alterar a ação ou a biodisponibilidade do medicamento pela mudança na farmacocinética (absorção, biotransformação e excreção), farmacodinâmica (mecanismo de ação) e consequentemente a ação definindo uma resposta terapêutica adequada, inferior à desejada ou tóxica (EL DESOKY et al., 2006). Ozdemir e colaboradores (2001) sugeriram a existência de uma alta incidência de reações adversas graves não relacionadas com aspectos farmacocinéticos ou farmacodinâmicos. Segundo estes autores a causa desta variabilidade poderia ser revelada através de estudos farmacogenéticos (OZDEMIR et al., 2001).

A farmacogenética, uma das grandes evoluções nas ciências farmacêuticas, tem sua abordagem derivada da análise completa do genoma humano e do projeto internacional HapMap (<http://www.hapmap.org>) e sua associação com a resposta terapêutica a determinada classe de medicamentos ou a um determinado fármaco específico. Simon e Wang (2006) definiram este estudo como sendo “a ciência que determina os benefícios e/ou efeitos adversos dos medicamentos que podem variar nos distintos grupos de pacientes em função do perfil genético dos indivíduos” (SIMON, R.; WANG, 2006). Assim, a avaliação da farmacogenética em estudos

clínicos representa uma importante ferramenta para melhor compreensão da relação existente entre medicamento, doença e paciente. Dessa forma, aplicável no desenvolvimento de novos medicamentos e estabelecimento de tratamentos cada vez mais individualizados (AK, 2007).

Duas abordagens podem ser consideradas em estudos farmacogenéticos, a primeira caracteriza-se pelos estudos de Faraday e colaboradores (2007), em que demonstraram que a resposta farmacológica do AAS pode ser modificada pela presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) e pelo estudo de Trenk e colaboradores (2008), que verificaram a implicação pontual da presença de um único SNP (rs4244285) do gene *CYP2C19* em relação às respostas ao tratamento com clopidogrel (FARADAY et al., 2007; TRENK et al., 2008). A segunda abordagem relaciona o perfil de expressão gênica em função do conteúdo diferencial dos transcritos de RNA mensageiro (RNAm), com a evolução clínica e a medida terapêutica adotada, como o estudo de Rosell e colaboradores (2007), que correlacionaram a resposta à quimioterapia com a expressão diferencial de determinados genes. Estas duas estratégias definem a farmacogenômica e cria a possibilidade de encontrar novos marcadores de prognóstico para auxílio na conduta terapêutica (ROSELL et al., 2007).

Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo corroboram com o grande potencial nos estudos genômicos. Estudos de associações entre alterações genéticas como a hipercolesterolemia, diabetes, hipertensão, doença cardiovascular (DCV) e IAM reforçam a importância dessa proposta (FORTI, et al., 2003). Também observamos as associações de aumento de risco para DCV e elevação de valores lipídicos e lipoproteínas com alterações pontuais em genes envolvidos no metabolismo lipídico e outras proteínas tais como: apolipoproteína AI (SORKIN et al., 2005), apolipoproteína B (CAVALI et al., 2000; MACHADO et al., 2001), apolipoproteína E (SALAZAR et al., 2000), receptor de LDL (*LDL*) (SALAZAR et al., 2000; SALAZAR et al., 2000; SALAZAR et al., 2002), *PPAR γ* (TAVARES et al., 2005; TAVARES et al., 2005), paraoxonase (*PON*) (R, 2008), enzima conversora de angiotensina (*ACE*) (SAKUMA et al., 2004) e óxido nítrico sintase (*eNOS*) (HIRATA, et al., 2002). Alterações em genes relacionados com a resposta terapêutica às vastatinas também foram descritas (ARAZI et al., 2008; RODRIGUES, et al., 2006).

Outros autores mostram que a natureza e o número de genes envolvidos no desenvolvimento de DCV e IAM não se encontram totalmente elucidados (DOEVENDANS et al., 2001). Estima-se que mais de 400 genes estejam implicados no processo aterosclerótico, envolvendo a disfunção endotelial, a coagulação, a inflamação e o metabolismo lipídico e glicídico (DOEVENDANS et al., 2001). O acréscimo de outros fatores, como a ACTP e o tratamento

farmacológico, torna ainda mais complexa a relação existente entre os genes envolvidos nestes processos.

Para obter informações mais completas referentes ao nosso genoma é necessária a utilização de técnicas de alto desempenho para um melhor mapeamento gênico. Este sistema pode ser os microarranjos de DNA que permitem realizar a genotipagem e a análise diferencial dos transcritos (transcriptômica) para avaliação do tratamento ou progressão de doenças, como o IAM (DOMON; AEBERSOLD, 2006; KOIZUMI, 2004).

No âmbito da genotipagem em larga escala, Samani e colaboradores (2007) analisaram amostras de dois grandes estudos clínicos, o *Wellcome Trust Case Control Consortium* (WTCCC, 2007) e o *The German MI Family Study*. Nesses trabalhos verificaram que alguns *loci* genéticos individuais ou agregados estão associados com o risco para o desenvolvimento da DCV (BROECKEL et al., 2002; SAMANI et al., 2009). É importante ressaltar que os resultados obtidos não podem ser diretamente inferidos para a população brasileira, pois foram avaliados pacientes de origem restritamente européia, e atualmente existe escassa informação sobre o impacto da genética miscigenada nos estudos de associação de polimorfismos (SUAREZ-KURTZ, 2005).

O estudo transcriptômico está sendo aplicado em diversas doenças, como cânceres de mama, ovário, próstata, estômago, colo retal e leucemias (CHATTERJEE; ZETTER, 2005); doenças pulmonares, como fibrose pulmonar idiopática, edema pulmonar e asma (TZOUVELEKIS et al., 2004); doença de Alzheimer (MARCOTTE et al., 2003) e aterosclerose (TUOMISTO; YLÄ-HERTTUALA, 2005). Waehre e colaboradores (2006) verificaram aumento na expressão dos genes *RANTES* e *MIP-1b* em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com DAC tratados com clopidogrel (WAEHRE et al., 2006).

A análise do conteúdo diferencial de RNAm de leucócitos se apresenta promissora na caracterização de doenças e no acompanhamento terapêutico, como vem sendo demonstrada em estudos com lúpus eritematoso sistêmico, leucemia mielóide crônica, carcinoma renal e resposta a alguns medicamentos (DEBEY et al., 2006). No estudo de Tang e colaboradores (2003) foi possível verificar que a expressão gênica de leucócitos totais pode ser utilizada para distinguir doenças cerebrais em modelos animais, uma vez que genes como *SLC18A2* e *DUSP1* estão com sua expressão relativa aumentada neste modelo (TANG et al., 2003).

Atualmente sabe-se que as células endoteliais progenitoras circulantes (CEP) presentes no sangue são importantes na hemostasia (HILL, J. M. et al., 2003), neovascularização (RABELINK et al., 2004) e na regeneração miocárdica após IAM (BLANN; PRETORIUS, 2006; YOON et al., 2005). O recrutamento dessas células causa possivelmente uma alteração no perfil de transcritos

das células do sangue periférico. A progressão de lesões e disfunções endoteliais em doenças cardiovasculares foi relacionada com a depleção dessas células, que por sua vez, estão relacionadas com o estresse oxidativo, atividade do óxido nítrico e outros processos fisiológicos (DANDONA et al., 2005).

Estudos que abordam a análise transcriptômica concomitantemente com a determinação de SNPs (genotipagem) e seus fenótipos revelam maior compreensão e maior potencial clínico no diagnóstico e tratamento individualizado de uma doença. Huang e colaboradores (2007) avaliaram a relação entre o efeito citotóxico ao tratamento quimioterápico com cisplatina, com diferentes genótipos e a expressão gênica de linhagens celulares derivadas de duas populações do projeto HapMap, os descendentes europeus (CEU) e africanos (YRU) (HUANG et al., 2007). Os autores demonstraram que o genótipo TT para o SNP rs456998 estão associados com o aumento da expressão do gene *NEK2* e aumento da sensibilidade à cisplatina e o SNP rs8094647 com a IC_{50} ($p = 2 \times 10^{-5}$) e com a expressão do gene *MYC* ($p = 1 \times 10^{-6}$).

Hagg e colaboradores (2008) propuseram pesquisar novas alterações gênicas a partir de sua expressão total em macrófagos de 15 pacientes com aterosclerose e 15 indivíduos saudáveis utilizando a plataforma de microarranjo de DNA, *Human HG-U133A* (Affymetrix®), identificando três genes diferentemente expressos que proporcionou dados para estudos de novos SNPs nos genes *IRS2*, *CD86* e *SLC11A1* (HÄGG et al., 2008). A expressão do gene *IRS2* foi significativamente maior no grupo de aterosclerose em relação aos controles, que por sua vez, verificaram que está relacionada com a presença do genótipo CC para o SNP -765C/T na região promotora e o maior risco ao desenvolvimento de DCV.

Dessa forma, considerando o grande potencial de aplicação da farmacogenômica no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e no esclarecimento da variação existente no tratamento antiagregante, o presente estudo visou estabelecer qual seria a influencias da genômica na variação da resposta terapêutica em pacientes com dupla terapia antiagregantes.

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver o estudo farmacogenômico dos inibidores da ativação da agregação plaquetária em pacientes que utilizam concomitantemente AAS e clopidogrel, com a finalidade de determinar a influência da genômica na variação da resposta terapêutica.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1. Avaliar o perfil da resposta a inibição a agregação plaquetária em relação aos principais fatores de risco para doença cardiovascular, utilizando o sistema *VerifyNow*[®].

2.1.2. Desenvolver um método analítico capaz de determinar as concentrações plasmáticas dos antiagregantes: clopidogrel e seu metabolito, como também do AS por LC-MS/MS e sua relação com a variação na resposta antiagregante.

2.1.3. Estudar a associação de polimorfismos e haplótipos dos genes que estão envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica do clopidogrel e do AAS através do sistema *Massarray SNP Sequenom*[®].

2.1.4. Avaliar a correlação entre variação da resposta aos antiagregantes no perfil de expressão genômica total de RNAm das células do sangue periférico, utilizando *Exon Array ST 1.0 Affymetrix*[®].

3. MATERIAL E MÉTODO

3. 1. CASUÍSTICA

Foram selecionados no Setor de Hemodinâmica do Hospital do Meixoeiro, Vigo, Espanha, previamente à realização da ACTP, indivíduos de ambos os sexos com idade entre 30 e 80 anos, com sintomas ou sinais de isquemia do miocárdio, com lesões ateromatosas graves (>75% por estimacão visual ou >50% por estimacão angiográfica automática quantitativa). Os indivíduos estavam obrigatoriamente sob tratamento de dupla antiagregacão plaquetária com clopidogrel e AAS na dosagem de 75 mg e 100 mg respectivamente, por via oral e em dose única por dia e por um período prévio a ACTP de no mínimo 5 dias anteriores a inclusão no estudo (BESCÓS, *et al.* 2000).

Dados biodemográficos e clínicos, como idade, sexo, hábito de fumar, a presença de diabetes, hipercolesterolemia, hipertensão, outros medicamentos administrados, data e da última vez que tomou o clopidogrel e o AAS foram obtidos através de preenchimento de questionário.

Todos os indivíduos foram informados sobre o estudo e em concordância da participacão, foi obtido de cada um deles o Termo de Consentimento Livre e Informado. O projeto foi aprovado pelo CEP/Hospital do Meixoeiro – Espanha, CEP Dante Pazzenese (Nº 3779, Anexo1), CEP/USP (No. 505, Anexo 2) e pelo CONEP (Nº 15419, Anexo 3).

3.1.1. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão deste estudo foram à presença de quaisquer das seguintes condições: contra-indicacão para o uso de clopidogrel ou AAS, insuficiência renal crônica, insuficiência hepática, insuficiência respiratória, doenças hemorrágicas, doenças endócrinas, neoplasias, hipercolesterolemia familiar conhecida ou presente em membros da família, uso de anticoagulantes orais, antagonistas GPIIb/IIIa e de drogas ilícitas.

3.1.2. Cálculo amostral

Para o cálculo amostral inicial deste estudo, levou-se em consideracão o valor de frequência de não respondedor ao AAS e ao clopidogrel de 6,7 e 21%, respectivamente, para o sistema de avaliacaão da inibicão da agregacão plaquetária *VerifyNow*[®] (Accumetrics, San Diego, EUA), (LORDKIPANIDZE *et al.*, 2007 e MALININ *et al.*, 2007). A quantidade mínima de cinco réplicas biológicas para cada grupo definido como respondedor ou não respondedor, nas análises de expressão gênica global de acordo com o estudo de Nanni e colaboradores (NANNI *et al.*,

2006). Consideraram-se também a frequência do alelo raro (FAR) da presença de alterações polimórficas superiores a 5% para os SNPs, presentes nas rotas da farmacocinética e farmacodinâmica dos antiagregantes plaquetários. Desta forma, se define inicialmente que o número mínimo de indivíduos para este estudo foi de 340, sendo que 82 destes seriam selecionados para análise de expressão gênica global de RNAm, utilizando como parâmetros estatísticos para testes de proporção binomial com alfa de 0,05 e beta de 0,05 (potência de 95%), assumindo que 10% dos dados seriam perdidos.

3.2. AMOSTRA BIOLÓGICA

Para todas as determinações foram obtidas amostras de sangue total, coletadas por punção da veia antecubital, utilizando o sistema de coleta a vácuo. As coletas foram realizadas no setor de Hemodinâmica do Hospital do Meixoeiro pela equipe de enfermagem, somente após a obtenção do consentimento livre esclarecido concordando com a participação na pesquisa.

Prévio ao procedimento de ACTP, coletou-se dois tubos de 2 mL contendo citrato de sódio a 3,2% para a determinação da resposta a inibição da agregação plaquetária; um tubo de 5 mL contendo heparina, para a determinação da concentração dos antiagregantes plaquetários; e dois tubos de 4 mL cada, contendo EDTA, para a obtenção de DNA, todos os tubos de coleta foram do modelo *vacutainer*TM (Becton Dickinson Co., Plymouth, Reino Unido), e três tubos de 2,5 mL com conservante de RNA para a sua obtenção que foram do modelo *PAXgene*[®] *Blood RNA* (Preanalytix GmbH, Hombrechtikon, CH).

3.3. DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA A INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

As resposta específicas a inibição da agregação plaquetária referente a cada medicamento (AAS e clopidogrel) foram determinadas no mesmo momento da obtenção das amostras, não superando 4 horas desde a hora da coleta. Foram considerados como valores de corte, para pacientes categorizados como respondedores, os resultados de agregação superior a 30% de inibição de ou inferior a 550 ARU para o tratamento com clopidogrel e AAS, respectivamente (MALININ et al., 2007; NIELSEN et al., 2008).

As resposta a inibição da agregação plaquetária foram determinadas pelo sistema qualitativo *Accumetrics*[®] *Ultegra Rapid Platelet Function Assay* (RPFA) aspirina e RPFA clopidogrel utilizando o equipamento *VerifyNow*[®] (Accumetrics, San Diego, EUA), de acordo com instruções do fabricante, utilizando como material de análise o sangue total. Este sistema tem como base a medida da turbidimetia após indução da agregação pelo fibrinogênio incorporado em

micro esferas. A especificidade da inibição da via de agregação pelo AAS ou pelo clopidogrel é possível pela utilização de agonistas específicos para cada fármaco, sendo o ácido araquidônico para o AAS e ADP para o clopidogrel (MALININ et al., 2007; NIELSEN et al., 2008). O cálculo da porcentagem de PRU é referente à comparação dos valores obtidos pelo sistema em PRU e sua referencia determinada com a adição de um agonista para a ativação plaquetária independente das vias de inibição da AAS e do clopidogrel.

3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DOS ANTIAGREGANTES E METABÓLITOS

As determinações das concentrações destes fármacos foram realizadas em colaboração com o Instituto de Ciências Forense Luiz Concheiro da Universidade de Santiago de Compostela (USC), durante estágio no exterior sob supervisão da Dra. Marta Concheiro e do Professor Catedrático Manuel Lopez Rivadulla da USC, Espanha.

As concentrações plasmáticas do clopidogrel, seu metabolito majoritário e o ácido salicílico (AS) metabolito do AAS, foram determinados utilizando como método de extração dos compostos, o procedimento de precipitação de proteínas com acetonitrilo, seguidas pela análise quantitativa por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa do tipo triploquadrupolo (LC-MS/MS). Foram utilizadas como padrões, as moléculas de AS, clopidogrel e seus metabólitos sendo sintetizados comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA e Galchimia, Santiago de Compostela, Espanha, respectivamente), e como padrões internos (PI) foram utilizados o ácido 6-metoxisalicílico (para o modo de polarização negativo) e o padrão interno deuterado, Diazepam-d₅ (para o modo de polarização positivo). Para a padronização dos métodos de extração, cromatográfico e de detecção foram utilizadas como base as metodologias descritas por Ohwaki, Shin e Yoo (OHWAKI et al., 2007; SHIN, B. S.; YOO, 2007).

Para a validação do método proposto foi possível determinar os parâmetros incluindo linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), imprecisão, recuperação, eficiência de extração, eficiência do processo, efeito matriz, seletividade, integridade de diluição, e estudo de estabilidade. A linearidade foi determinada pelo teste de regressão *least-squares* ($1/x^2$). Foi considerada como linearidade aceitável quando o coeficiente obteve valores superiores a 0,99 e a quantificação dos calibradores não superarem a variação de $\pm 20 \%$ para o limite inferior de quantificação e $\pm 15 \%$ para as demais concentrações. O limite inferior de detecção (LID) e o limite inferior de quantificação (LIQ) foram avaliados com concentrações decrescentes dos padrões em plasma. LID foi definido como a concentração mais baixa do padrão utilizado que

apresentou uma cromatografia aceitável, a presença de todos os íons de qualificação com uma razão sinal ruído não inferior a 3, e com o tempo de retenção (TR) com $\pm 0,2$ minutos do TR do calibrador. O LIQ foi definido como a concentração mais baixa do padrão que obedecesse aos mesmos critérios definidos para o LID, mas com uma razão sinal ruído não inferior a 10, imprecisão menor que 20% e com uma recuperação entre 80-120 %.

A imprecisão e a recuperação analítica foram determinadas com duas concentrações distintas, analisadas com cinco réplicas, em quatro dias diferentes ($n = 20$). A imprecisão é expressa em porcentagem relativa do desvio padrão (% RDP) dos valores medidos, sendo esperados valores inferiores a 15% para este parâmetro. O guia estabelecido por Krouwer e Rabinowitz (1984), descreve os cálculos para o conjunto de parâmetros como o intradia, interdia, e imprecisão total (KROUWER; RABINOWITZ, 1984). A recuperação analítica foi avaliada de acordo com a porcentagem da concentração alvo ($n=20$) com o critério de variação estabelecido de 85-115%.

A eficiência da extração para cada composto foi determinada para cada concentração da solução do controle de qualidade (CQ). No plasma branco foram adicionados tanto as soluções do CQ quanto do PI, antes e depois da extração por precipitação de proteínas. A eficiência da extração do plasma foi expressa como a média da área das amostras ($n=5$), que foram adicionados às soluções controle antes da precipitação, dividido pela média da área das amostras ($n=5$) com as soluções controles, adicionadas depois da precipitação.

O efeito matriz foi determinado com a comparação das áreas dos picos dos padrões em 10 amostras brancas distintas de plasma, que foram adicionadas com as soluções dos CQ e PI depois da precipitação de proteínas com as áreas dos picos das amostras de mesmas concentrações nominais, preparadas com a mistura da fase móvel da cromatografia.

A eficiência do processo avalia tanto o efeito da extração por precipitação de proteínas quanto o efeito da matriz na quantificação dos compostos de interesse. Esta determinação é realizada com a comparação da média das áreas dos picos de cinco amostras que foram adicionadas às soluções controles, antes da precipitação, com a média das áreas dos picos de cinco amostras preparadas com fase móvel de mesmas concentrações que as anteriores.

O efeito de diluição sobre a linearidade do método foi avaliada pela diluição de amostras de plasmas ($n=3$) contendo 2000 e 5000 ng/mL de cada composto com plasma branco na proporção de 1:10. O PI foi adicionado às amostras e seguirão para o processo de precipitação de proteínas. A reprodutibilidade da diluição foi considerada mantida se as amostras quantificadas apresentassem concentrações que variassem de $\pm 15\%$ de 20 e 50 ng/mL. A estabilidade dos compostos

analisados foi avaliada com a adição das soluções padrões em plasma, na qual posteriormente foram estocadas a temperatura ambiente (22°C) por 24 horas; no refrigerador (4°C) por 72 horas; e depois de três ciclos de congelamento e descongelamento (congelamento por 24 horas, seguido de temperatura ambiente por 2 horas). A estas amostras de plasma, foram adicionados todos os três compostos em duas concentrações distintas (baixa e alta solução de CQ) em triplicatas. A estabilidade foi considerada aceitável se os CQ quantificados apresentassem concentrações com uma variação de $\pm 15\%$ em relação à concentração nominal.

Os critérios para a identificação dos compostos incluíram: TR com $\pm 0,2$ minutos do TR do calibrador, presença de três transições, e a relativa intensidade do íon (% do pico da base) com $\pm 20\%$, se a intensidade relativa do íon for $>50\%$; $\pm 25\%$ se for 20-50%; $\pm 30\%$ se for 10-20%; e $\pm 50\%$ se for $\leq 10\%$ (European Union Commission, 2002). As intensidades relativas do íon foram calculadas baseadas na razão do íon (transição mais abundante dividido pela razão menos abundante). Estas razões foram comparadas com as médias relativas da intensidade dos íons de cada calibrador.

3.5. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

3.5.1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico utilizando o conjunto de reagente *QIAamp[®] DNA Blood* (Qiagen Inc., Valencia, EUA), seguindo a orientação do fabricante. A qualidade e pureza do DNA obtidas foram determinadas utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop[®] ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, EUA), e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Até o seu processamento as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

3.5.2. Determinação dos SNPs

Para a escolha dos SNPs utilizou-se o banco de dado público dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Como argumentos de busca destes SNPs, foram selecionados tantos os SNPs presentes em genes que estavam envolvidos na farmacocinética quanto na farmacodinâmica do AAS e do clopidogrel (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *GPIIb/IIIa*, *COX-1* e *P2RY12*), como os SNPs que apresentam uma FAR superior a 5% para SNPs contidas em regiões codificantes e superior 10% para SNPs em regiões regulatórias como promotoras, 3'UTR, 5'UTR e *splicing*. Estes resultados validados, também foram apresentados por outros estudos ou já estabelecido pelo projeto HapMap.

A determinação dos SNPs foi realizada através do sistema *Massarray SNP* (*Sequenom Inc.*, San Diego, *EUA*) em colaboração com o Centro Nacional de Genotipagem da Espanha (CeGen), cujo princípio é a determinação de SNPs de acordo com o tamanho e massas moleculares detectadas por espectrometria de massa.

3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.6.1. Extração de RNA total

Para a extração do RNA foi utilizado conjunto de reagente *PAXgene® Blood RNA* (Preanalytix GmbH, Hombrechtikon, CH). As amostras foram concentradas de acordo com o protocolo do *GeneChip® Blood RNA Concentration Kit* (Preanalytix GmbH, Hombrechtikon, CH e Affymetrix®, Inc., Santa Clara, EUA).

A integridade do RNA obtido foi avaliada através da eletroforese capilar da *Agilent® RNA 6000 NanoChip Kit* utilizando o equipamento *Agilent® 2100 bioanalyzer* (Agilent® Technologies Inc., Santa Clara, EUA). Foram estudadas apenas as amostras de RNA extraídas em que o número de integridade de RNA (RIN, *RNA Integrity Number*) foi maior que sete. A quantificação e pureza do RNA foram realizadas por espectrofotometria a 260 nm pelo *Nanodrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, EUA).

3.6.2. Determinação da expressão gênica diferencial por microarranjos

Para análise de expressão diferencial de RNA as amostras foram processadas de acordo com as recomendações da plataforma *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay* (Affymetrix®, Inc., Santa Clara, EUA), a qual utiliza o microarranjo de DNA denominado *GeneChip Exon 1.0 ST Array* (Affymetrix®, Inc., Santa Clara, EUA).

O processamento das amostras se iniciou com a remoção de RNAs ribossômicos com o conjunto de reagentes *RiboMinus® Transcriptome Isolation Kit (Human)* (Invitrogen, MD, EUA). O protocolo executado foi de acordo com as modificações propostas no manual *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay* (Affymetrix, Inc., Santa Clara, EUA). As etapas posteriores à remoção de RNAs ribossômicos consistem em: concentração do RNA restante; síntese da primeira e segunda fita do DNA complementar (cDNA) e amplificação; síntese de RNA complementar (cRNA) ou seja, fita simples complementar ao cDNA por transcrição *in vitro* (IVT); hidrólise da fita simples de cRNA através de *RNAseH*. Estes procedimentos foram realizados utilizando o conjunto de reagente *Sample Cleanup Module e WT cDNA Synthesis and*

Amplification Kit (Affymetrix[®], Inc., Santa Clara, EUA) e *WT Terminal Labeling Kit* (Affymetrix[®], Inc., Santa Clara, EUA).

A amplificação do RNA com marcação foi realizado de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do microarranjo, considerando o uso de um termociclador *Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e um conjunto de soluções para hibridização e o sistema *GeneChip[®] Hybridization Oven 640* (Affymetrix[®], Inc., Santa Clara, EUA). As lavagens e a coloração, foram processadas utilizando a estação *GeneChip[®] Fluidics Station 450* (Affymetrix, Inc., Santa Clara, EUA), nesta fase utilizou-se um anticorpo conjugado a uma molécula emissora de luz que forneceu a fluorescência detectada pelo sistema de captura de imagem *GeneChip[®] Scanner 3000 7G* (Affymetrix[®], Inc., Santa Clara, EUA), todo esse conjunto de sistema foi operado utilizando o programa *GeneChip[®] Operating Software* (Affymetrix[®], Inc., Santa Clara, EUA) no laboratório da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha, em colaboração com o Grupo de pesquisa em genômica clínica liderado pelo Prof. Catedrático Angel Carracedo.

3.6.3. Análise de expressão gênica pela PCR em tempo real

Os genes de interesses identificados nos ensaios de microarranjos, incluindo os genes associados à rota metabólica dos antiagregantes como expressão diferenciadas foram analisados e validados pela PCR em tempo real.

Para a síntese do cDNA foi utilizado o conjunto de reagentes para a reação de transcriptase reversa *SuperScript[™] II* (Invitrogen, Gathersburg, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20° C até o processamento da PCR em tempo real. Para essa finalidade, foram utilizados o sistema *TaqMan[®]* e o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems[®], Foster City, EUA).

Os iniciadores e sondas (marcadas com fluoróforos) específicos para cada gene estudado, foram selecionados e adquiridos da empresa *Applied Biosystem[®]* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) de acordo com os ensaios já customizados. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa de informática *System 7500 software* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A quantificação relativa para cada gene selecionado para a validação técnica foi determinada através da metodologia de comparação de Ct (*cycle threshold*) (PFAFFL, 2001), utilizando a fórmula $2^{-\Delta Ct}$, na qual o ΔCt é a diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene referencia gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Considerou-se gene validado tecnicamente quando o resultado da expressão relativa determinada pela PCR em tempo real e o logaritmo da intensidade normalizada e sumarizada obtido por microarranjos de DNA segue um dos seguintes critérios: 1) semelhança entre os perfis de variação de expressão, denominado FC; 2) correlação significativa de Spearman de moderada ($r \geq 0,40$; $p < 0,05$) a forte ($r \geq 0,60$; $p < 0,05$).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados da pesquisa foi construído na plataforma SPSS versão 15.0 para Windows (IBM® corporation, Somers, EUA), com posterior verificação de consistência da digitação. Para as análises estáticas dos dados descritos como variáveis contínuas paramétricas e não paramétricas utilizou-se os testes de Kolmogorov-Smirnov, Test-t, ANOVA, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis; estudos de correlação de Pearson e Spearman. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado para validar os SNPs estudados. Para as variáveis categóricas foram realizados os testes de Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher. Considerando o modelo teórico do estudo, as variáveis independentes e os desfechos foram devidamente trabalhados no sentido de comporem um modelo de análise multivariada, do tipo regressão logística e linear conforme cada caso de análise. Neste sentido, os efeitos das variáveis independentes ou covariáveis foram ajustados para observar os principais desfechos a partir do cálculo da OR (*Odds Ratio*) ajustada e seus respectivos intervalos de confiança. Outras estratégias de análise foram aplicadas, dependendo do comportamento das variáveis do estudo, considerando as potencialidades do modelo teórico utilizado.

Dessa forma para o estudo em relação à resposta ao clopidogrel utilizou a análise de regressão logística na qual foi considerado como variável dependente a resposta ao clopidogrel ajustando a análise incluindo as variáveis: Tempo desde a ultima dose de clopidogrel (TUDC); tempo desde a ultima dose de AAS (TUDA); hábito de fumar; Hipertensão; diabetes e ARU. Para a regressão logística em relação à resposta ao AAS foi utilizando como variável dependente a resposta ao AAS, ajustando a análise incluindo como variável a idade e sexo dos pacientes. Para ambas as análises foram utilizadas todos os cinco principais modelos de herança a definir: recessiva (AA+AB/AA), codominante (AA+BB/AB), dominante (AB+BB/AA), aditiva (AA/AB/BB), alélica (A/B) e haplotípicas.

Para a análise estatística específica para avaliação do estudo de expressão gênica global de RNAm, os dados foram analisados utilizando os programas *Partek® Genomics Suíte* (Partek®

Incorporated, Co., St. Louis, EUA) e *Ingenuity Pathways Analysis 6* (Ingenuity Systems, Ca., Redwood City, EUA), com a finalidade de estabelecer os genes diferentemente expressos e a relação funcional entre eles.

Para a análise estatística específica dos SNPs estudados, foi definido como a melhor estratégia de estudo, realizar a comparação entre os resultados de duas plataformas distintas para o estudo de associação do SNPs e seus haplótipos com a resposta aos antiagregantes plaquetários. Foram utilizadas a plataforma de análise estatística *SNPator* (www.snpator.org) desenvolvida pelo Centro Nacional de Genotipado, Espanha (CeGen) e pelo Instituto Nacional de Bioinformática, Espanha, que foram gentilmente concedido o seu uso pelo laboratório do Prof. Catedrático Angel Carracedo; e o programa *Haploview 4.2* desenvolvido pelo Instituto Broad do MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) e a Universidade de Harvard (BARRETT, et al., 2005), disponibilizado gratuitamente para a sua utilização.

Os resultados foram considerados significativos quando obtiveram valores para o valor de p (p) inferiores a 0,05 para os testes estatísticos convencionais, já para o estudo de SNPs foi determinado o valor de p após os resultados sofrerem as correções pertinentes como os ajustes por permutação (considerando um valor mínimo de 1000 eventos) ou aplicando o teste de correção de Bonferroni (HOGGART et al., 2004) ambos os testes utilizados para solucionar o problema das análises de comparações múltiplas, uma vez que se trabalhou com um grande número de SNPs e amostras.

Para melhor ajustar os dados obtidos referente à resposta ao clopidogrel e AAS, os valores de PRU e ARU foram categorizados em quartis sendo que o primeiro quartil (Q1) representa os pacientes com melhor resposta a inibição a agregação plaquetária e o quarto quartil (Q4) representam os indivíduos de pior resposta. Os dados de TLDC e TLDA também foram categorizados, mas agora em tercil, sendo o primeiro tercil o grupo representante dos pacientes com um menor tempo de administração desde última dose medicamentosa e os pacientes incluídos no terceiro tercil representam o grupo de tempo maior desde última dose medicamentosa.

4. RESULTADOS

4.1. RESPOSTA A INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A casuística foi constituída de um total de 338 pacientes, durante todo o período que se estendeu de fevereiro de 2008 a dezembro de 2009. Após a obtenção de todos os dados e uma análise preliminar dos mesmos foram excluídos 20 (6%) pacientes por apresentarem alguns dos critérios de exclusão definidos no estudo (material e método item 3.1.1), totalizando 318 (94%) pacientes que prosseguiram para as fases seguintes do estudo.

Foi observada primeiramente, uma alta porcentagem de pacientes não respondedores para o clopidogrel (64%) ao contrário dos pacientes classificados com não respondedores a AAS (10%). Interessantemente do total dos pacientes incluídos no estudo 6% (18 pacientes) foram classificados como não respondedores para ambos os tratamentos (tabela 1).

O estudo de associação entre as variáveis categorias e o perfil de resposta dos pacientes mostra que o hábito de fumar e o não respondedor ao clopidogrel e ao AAS foram significantes ($p < 0,041$, $p < 0,026$ respectivamente). As variáveis como diabetes, hipertensão e tempo a partir da última dose de clopidogrel e AAS (TUDC e TUDA, respectivamente) apresentaram uma significância importante ($p < 0,012$) em relação aos não respondedores. Sendo que a frequência de pacientes diabéticos e hipertensos foi maior no grupo de não resposta ao clopidogrel (23% versus 39% para diabetes e 71% versus 83% para hipertensos) e apresentaram o aumento de 2 horas sobre TUDC e TUDA em relação aos pacientes respondedores. Entretanto as concentrações plasmáticas do clopidogrel, seu metabolito majoritário e AS não apresentaram diferenças significantes ($p > 0,050$), na comparação entre os grupos de respondedores e não respondedores.

Ao realizar um estudo de regressão logística multivariada, considerando as variáveis diabetes, hipertensão, hábito de fumar, TUDC, TUDA e resposta ao AAS como covariáveis que podem explicar este modelo, verificou-se que somente o fato do paciente ser diabético aumenta o risco deste paciente pertencer ao grupo de não resposta ao clopidogrel em mais de duas vezes (O.R.= 2,04; IC95%= 1,17-3,58; $p = 0,010$), com resultados não significativos para as demais variáveis introduzidas ($p > 0,050$).

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes subdivididos em relação à resposta aos antiagregantes.

	CLOPIDOGREL				AAS		
	Total (318)	Resp. (114)	Não Resp. (202)	<i>p</i>	Resp. (281)	Não Resp. (33)	<i>p</i>
<i>Dados Clínicos</i>							
Idade (anos)	69 (61-77)	68 (60-75)	70 (62-77)	0,122	69 (61-76)	74 (66-80)	0,004
Sexo (masculino)	81(258)	83 (95)	80 (162)	0,492	83 (234)	67 (22)	0,022
Fumantes	7 (21)	11 (13)	4 (8)	0,041	6 (18)	3 (1)	0,442
H. familiar	19 (61)	19 (22)	18 (37)	0,830	19 (54)	18 (6)	0,886
Hipertensão	79 (250)	71 (81)	83 (168)	0,011	79 (221)	82 (27)	0,672
Diabetes	33 (106)	23 (26)	39 (79)	0,003	32 (90)	42 (14)	0,230
Dislipidemia	77 (244)	80 (91)	76 (154)	0,566	78 (218)	70 (23)	0,540
IMC (Kg/m2)	28 (26-30)	28 (26-30)	28 (26-30)	0,953	28 (26-30)	28 (26-30)	0,864
<i>Terapia Antiagregante</i>							
TUDC (h)	19 (5-21)	19 (4-20)	20 (6-23)	0,012	19 (5-22)	16 (4-20)	0,146
PRU (unidades)	228 (174-283)	164 (124-198)	268 (220-302)	0,001	226 (174-284)	237 (149-272)	0,863
CLO (ng/mL)	4 (3-8)	4 (3-8)	4 (3-9)	0,648	4 (3-8)	10 (4-29)	0,099
MCLO (ng/mL)	287 (161-898)	284 (158-826)	294 (161-956)	0,942	285 (162-898)	337 (176-789)	0,635
TUDA (h)	20 (15-21)	19 (14-20)	20 (16-23)	0,012	20 (15-21)	19 (9-21)	0,564
ARU (unidades)	423 (399-490)	410 (390-493)	434 (404-485)	0,026	417 (396-463)	577 (564-594)	0,001
AS (ng/mL)	187 (51-768)	259 (67-895)	124 (47-542)	0,064	182 (51 -755)	255 (44-794)	0,949

Os dados estão expressos em mediana (Percentil 25% – Percentil 75%) ou porcentagem (número absoluto). Os critérios de categorização dos pacientes em respondedores foram: Porcentagem de PRU > 30% e ARU < 550 para o grupo clopidogrel e AAS respectivamente. O valor de *p* (*p*) foi determinado pelo teste de Mann-Whitney U ou Teste de Qui-quadrado entre os grupos de respondedores para cada medicamento. H. familiar, histórico familiar; Resp.,respondedor; Não Resp., não respondedor; ARU, *aspirin reaction units*; PRU, *P2RY12 reaction units*; IMC, Índice de Massa Corporal; TUDC, Tempo desde ultima dose de clopidogrel; TUDA, Tempo desde ultima dose de AAS; CLO, clopidogrel; MCLO, metabólito do clopidogrel; AS, ácido salicílico.

Análise isolada dos dados de resposta ao AAS verificou-se que existe uma forte associação desta variável com a idade, sendo maior a média da idade do grupo não respondedor. A análise de correlação de Spearman para estas duas variáveis observou-se uma correlação positiva com um coeficiente de 0,16 ($p < 0,010$). Por outro lado, a diferença entre os grupos, respondedor e não respondedor em relação à média de idade, foi de aproximadamente 5 anos, e em uma análise de regressão linear em que utilizou-se como variável dependente o valor de resposta ao AAS em ARU e como variável independente a idade, observa-se que para cada incremento em uma unidade na idade dos pacientes tem-se um aumento de aproximadamente 1,3 ARU de resposta a inibição a ação antiagregante ($r^2 = 0,04$; $B = 1,30$; erro = 0,06; IC95% de $B = 0,59-2,01$; $p < 0,010$).

4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS E SEUS METABÓLITOS EM PLASMA

A seguir estão representados os principais resultados referente ao método analítico e validação para a determinação do clopidogrel, seu metabolito majoritário e do AS no plasma.

Na tabela 2 estão representados os principais parâmetros para os métodos cromatográficos e de massas estabelecidos para a separação e detecção de todos os compostos. Devido às características de tempo de retenção diferentes entre os compostos de mesmo modo de ionização, foi criado um método de detecção com a intermitência dos modos positivos e negativos.

Verificou-se tanto a linearidade do método como também se estabeleceu os seus limites de quantificação utilizando 10 plasmas controles negativos (sem medicamento). Foram obtidos os valores de 2 a 500 ng/mL para o clopidogrel (7 pontos de calibração), de 2 a 2000 ng/mL para o metabolito majoritário do clopidogrel (9 pontos de calibração) e de 20 a 2000 ng/mL para o AS (6 pontos de calibração).

O gráfico representativo da curva de referencia obtida no processo de padronização para quantificação do clopidogrel e seu metabolito, e do AS. Foi realizada em 4 replicatas e se utilizou como critério de corte um coeficiente (r^2) com valores inferiores a 0,98. Os resultados para os parâmetros da equação da reta para o clopidogrel foi de $2,3040 \pm 0,5299$ para o intercepto, inclinação igual a $2,7037 \pm 0,5374$ e r^2 igual a $0,9923 \pm 0,0019$, para o metabolito majoritário do clopidogrel obteve-se valores para o intercepto de $0,9044 \pm 0,1880$, inclinação igual a $1,1651 \pm 0,1285$ e r^2 igual a $0,9838 \pm 0,0028$, já para o AS, intercepto de $10,5486 \pm 6,2235$, inclinação de $0,7723 \pm 0,1151$ e r^2 igual a $0,9818 \pm 0,0174$.

Tabela 2. Parâmetros estabelecidos após desenvolvimento metodológico para o equipamento nos Modo de ionização, transição do monitoramento de reações múltiplas, voltagem do cone e energia de colisão selecionada para o CLO, MCLO, AS e os padrões internos, 6-MSA e DIA-d₅

Função	Composto	Transição	Cone (V)	Energia de Colisão (V)	TR (min)	PI
Função 1:	MCLO	308,2>152,2	25	25	5	DIA-d ₅
ISE +		308,2>198,3	25	17		
Função 2:	AS	137,0>64,8	26	26	6,1	6-MSA
ISE -		137,0>93,0	26	15		
	6-MSA	167,0>123,1	14	10	6,1	
Função 3:	DIA-d ₅	290,2>154,2	40	27	7,4	
ISE +	CLO	322,3>184,2	25	23	8	DIA-d ₅
		322,2>212,3	25	15		

CLO, clopidogrel; AS, ácido salicílico; MCLO, metabolito do clopidogrel; PI, padrão interno; DIA-d₅, diazepam-d₅; 6-MAS, ácido 6-metoxisalicílico; V, Voltagem; min, minutos; ISE, ionização por *spray* de elétrons.

Os resultados da validação do método proposto estão apresentados nas tabelas 3 e 4. A imprecisão total do método, medida através do coeficiente de variação, variou de 7,1 a 11,9 e a precisão do método medida em porcentagem variou de 91,8 a 102,7. As eficiências de extração máxima e mínima foram de 61,2 e 44,8 para o AS a 1000 ng/mL e 50 ng/mL para o metabolito do clopidogrel, respectivamente. Os resultados dos testes de efeito matriz apresentaram valores máximos e mínimos para a concentração de 100 ng/mL para o clopidogrel e concentração de 1000 ng/mL para o metabolito do clopidogrel (-44,2 e -2,2, respectivamente) (Tabela 3).

O teste de estabilidade desenvolvido observou-se que o composto de melhor estabilidade, independente do processo de armazenamento da amostra foi o clopidogrel em ambas as concentrações. Por outro lado, o AS apresentou baixa estabilidade, tendo seus valores variando de -42,4% para a concentração de 50 ng/mL às 72h a 4°C, como valor máximo e de -19,5% para a concentração de 1000 ng/mL com três ciclos de congelamento e descongelamento como valor mínimo (-20°C e Temperatura ambiente) (Tabela 4).

Tabela 3. Imprecisão, precisão, eficiência da extração, eficiência do processo e efeito matriz para o CLO, MCLO e AS.

Composto	CLO		MCLO		AS	
Concentração (ng/mL)	5	100	50	1000	50	1000
Imprecisão (n=20, CV)						
Intradia	9,3	7,6	7,2	6	8,2	5
Interdia	7,4	8,4	2,8	3,9	4,8	5,6
Total	11,9	11,3	7,7	7,1	9,5	7,5
Precisão (n=20, % alvo)	102,7	102,3	112,7	93,5	113,2	91,8
E.E. (n=5, %)	52,8	55	44,8	55,1	57,9	61,2
E.P. (n=5, %)	30	30,7	53,3	53,9	63,6	50,5
E.M. (n=10, %) $\pm$ CV (%)	-43,2 $\pm$ 7,9	-44,2 $\pm$ 9,4	19,1 $\pm$ 7,7	-2,2 $\pm$ 6,4	9,8 $\pm$ 8,9	-17,4 $\pm$ 4,9

CLO, clopidogrel; AS, ácido salicílico; MCLO, metabolito do clopidogrel; E.E, eficiência de extração; E.P, eficiência do processo; E.M, efeito matriz; e CV, coeficiente de variação.

Tabela 4. Estabilidade do CLO, MCLO e AS em três diferentes condições de armazenamento.

Composto	Clopidogrel		MCLO		AS	
Concentração (ng/mL)	5	100	50	1000	50	1000
24h 22°C (% , n=3)	-1,1	-3,2	12,7	30,1	-32,7	-29,3
72h 4°C (% , n=3)	-4,1	-3,5	0,7	27,5	-42,4	-22,8
3 F/D (% , n=3)	-0,7	-2,0	9,3	25,5	-27,3	-19,5

CLO, clopidogrel; AS, ácido salicílico; MCLO, metabolito do clopidogrel; e 3 F/D, três ciclos de congelamento e descongelamento (-20°C e Temperatura ambiente).

As análises de amostras dos pacientes, dentro do contexto de validação da metodologia desenvolvida, possibilitaram avaliar tanto a eficácia real do método, como também determinar as médias de concentração plasmáticas do clopidogrel, de seu metabólito e do AAS, dentro das características de administração dos fármacos antiagregantes plaquetários. Para o tratamento com o AAS observaram-se concentrações plasmáticas que variaram de 26 ng/mL a 1994 ng/mL, para o intervalo de 1 a 24 horas (valores referente ao intervalo de confiança 95%) (Tabela 5). Observou diferenças significativas entre os grupos de tercil em relação a ultima dose de AAS e a concentração plasmática do AS, seu metabólito ativo ($p = 0,001$).

Na análise dos resultados da tabela 6 observou-se a mesma tendência de diminuição das concentrações plasmáticas do clopidogrel e seu metabolito majoritário com a distribuição por tercil

de tempo desde última administração do clopidogrel. Esta diminuição de concentração foi significativa somente para o metabólito do clopidogrel apresentando valores de mediana e de percentil 25% - 75% de 939 (483-1375) ng/mL; 219 (135-371) ng/mL; e 210 (127-440) ng/mL para os grupos de tercil 1 (T1), tercil 2 (T2) e tercil 3 (T3) respectivamente, com uma variação de tempo de administração de 1 a 24 horas (Tabela 6).

Tabela 5. Concentrações plasmáticas de AS e resposta à inibição da agregação plaquetária categorizado de acordo com o tempo desde a última administração de AAS.

Variável	Tercil de TUDA				<i>p</i>
	Total (318)	T1(97)	T2(98)	T3 (97)	
TUDA, h	20 (15-21)	5 (3-15)	20 (19-20)	23 (21-24)	
ARU, unidades	423 (399-490)	421 (396-478)	418 (398-490)	430 (400-488)	0,854
AS, ng/mL	187 (51-768)	531 (75-1307)	116 (60-442)	100 (41-436)	0,001

Os pacientes foram agrupados de acordo com tercil de TUDA. As variáveis são representadas em mediana (Percentil 25% – Percentil 75%). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar a diferença existente entre os três grupos formados. ARU, *Aspirin reaction units*; TUDA, Tempo desde a ultima administração de AAS; AS, ácido salicílico.

Tabela 6. Concentrações e respostas à inibição da agregação plaquetária categorizado de acordo com o tempo desde a última administração de clopidogrel.

Variável	Tercil de TUDC				<i>p</i>
	Total (318)	T1(97)	T2(98)	T3 (97)	
TUDC, h	19 (5-21)	3 (2-5)	19 (18-20)	24 (21-24)	
PRU, unidade	228 (174-283)	227 (176-269)	207 (157-267)	243 (182-298)	0,055
CLO, ng/mL	4 (3-8)	4 (2-10)	5 (3-8)	4 (3-7)	0,995
MCLO, ng/mL	287(161-898)	939 (483-1375)	219 (135-371)	210 (127-440)	<0,001

Os pacientes foram agrupados de acordo com tercil de tempo desde ultima dose de clopidogrel (TUDC). As variáveis são representadas em mediana (Percentil 25% – Percentil 75%). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar a diferença existente entre os três grupos formados. PRU, *P2RY12 reaction units*; CLO, clopidogrel; MCLO, metabólito do clopidogrel.

4.3. POLIMORFISMO DOS GENES ENVOLVIDOS NA FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO CLOPIDOGREL E AAS

Utilizando a estratégia proposta para a identificação dos SNPs pertencentes à via da farmacocinética ou farmacodinâmica do clopidogrel e AAS como descrita no item material e métodos (3.5.2) permitiu a seleção de 19 genes e 207 SNPs (ANEXO 2). Para melhor descrever os resultados deste item, optou-se por dividir esta descrição em duas partes, a primeira foi referente à associação dos SNPs e Haplótipos com a resposta ao clopidogrel (4.3.1) e a segunda a associação dos SNPs e Haplótipos com a resposta ao AAS (4.3.2).

4.3.1. Associação dos SNPs e Haplótipos com a resposta ao clopidogrel

Para testar a hipótese da associação dos SNPs descritos acima (item 4.3) com a resposta a inibição da agregação plaquetária devida à ação farmacológica do clopidogrel, definiu-se como critério de categorização dos valores de corte definidos por Malinnin e Nielsen (MALINNIN et al., 2007; NIELSEN et al., 2008), ou seja, pacientes com valores de resposta inferiores a 30% foram considerados como não respondedores. Dessa forma, foram gerados três resultados distintos com o uso do programa *Haploview*. O primeiro resultado foi referente à análise das frequências alélicas em relação à resposta ao clopidogrel pelo teste de Qui-quadrado (Tabela 8), seguido da análise dos haplótipos destes SNPs para cada gene (Tabela 9) e a correção da significância das associações estabelecidas pelo teste de permutação (Tabela 10).

Tabela 7. Associação dos SNPs com a resposta ao clopidogrel com o teste de Qui-quadrado.

Gene	Código	Alelo Associado	Frequência	<i>p</i>
<i>CYP5A1</i>	rs2299890	G	0,679:0,522	<0,001
	rs7810415	C	0,589:0,451	<0,001
	rs2267679	C	0,522:0,384	<0,001
	rs7810727	C	0,714:0,588	0,001
	rs1978180	G	0,894:0,805	0,002
<i>CYP2C19</i>	rs3758580	T	0,168:0,073	<0,001
	rs4244285	A	0,172:0,077	0,001
<i>CYP2C9</i>	rs10509679	A	0,185:0,097	0,003
<i>GPIIa</i>	rs1421931	G	0,498:0,385	0,006

Teste realizado com valor de corte para pacientes respondedor > 30% de PRU. Somente estão representadas as associações com $p < 0,010$. *p*, valor de *p*.

Tabela 8. Associação dos blocos haplotípicos com a resposta ao clopidogrel.

Gene	Bloco	Haplótipo	Frequência	<i>p</i>
<i>CYP5A1</i>	Bloco 2 : GCC	0,465	0,512:0,381	0,001
	Bloco 3 : CC	0,541	0,589:0,453	<0,001
	Bloco 4: GTCTG	0,237	0,201:0,303	0,004
	Bloco 5 : TT	0,151	0,113:0,219	<0,001
<i>CYP2C19</i>	Bloco 1 : AATGCC	0,144	0,177:0,083	0,001
<i>CYP2C9</i>	Bloco 1 : ACTTCAA	0,157	0,188:0,101	0,004
<i>GP1Ia</i>	Bloco 7 : CCTGAGG	0,463	0,424:0,533	0,008

Teste realizado com valor de corte para pacientes respondedor > 30% de PRU. Somente estão representadas as associações com $p < 0,010$. *p*, p:valor. *p*, p:valor.

Tabela 9. Teste de permutação para a correção dos valores de *p* para as associações de SNPs e Blocos haplotípicos.

Gene	Código/Bloco	<i>p</i>
<i>CYP5A1</i>	rs2299890	0,004
	Bloco 4: GTCTG	0,002
	Bloco 5: TT	0,010
<i>CYP2C19</i>	rs4244285	0,005
	rs3758580	0,004
	Bloco 1: AATGCC	0,007

Teste realizado com valor de corte para pacientes respondedor > 30% de PRU. Somente estão representadas as associações com $p < 0,010$ após a realização da correção pelo teste de permutação (1000 permutações). *p*, valor de *p*.

Quatro SNPs se mantiveram significativamente associados com a resposta ao clopidogrel após correção da significância pelo teste de permutação, sendo que todos pertencem exclusivamente aos genes relacionados à farmacocinética do clopidogrel. O SNP referente ao código rs2299890 pertence ao gene *CYP5A1* e rs3758580 ao gene *CYP2C19* (Tabela 10).

Nas figuras 1 e 2 estão representados os diagramas dos blocos haplotípicos formados através da análise do desequilíbrio de ligação entre os SNPs de cada um dos genes que obtiveram valor de *p* igual ou inferior a 0,01 para o teste de associação após a aplicação do teste de correção por

permutação utilizando o programa *Haploview* (Tabela 10), dentro de cada quadrado está representado o valor de r^2 , indicando a correlação existente entre os SNPs pertencentes ao bloco haplotípico formado. Destacam-se dois blocos formados pelo gene *CYP5A1* (Bloco 4 e 5) e um bloco do gene *CYP2C19* (Bloco 1). Os SNPs do gene *CYP5A1* que correspondem ao Bloco 4 são: rs12540398, rs2214757, 12532529, rs8192810 e rs2299890 e ao Bloco 5 são: rs6464431 e rs7810727. Os SNPs do gene *CYP2C19* presente no Bloco 1 são: rs4244285, rs10786172, rs3758580, rs3758581, rs11597626 e rs1555474.

Figura 2. Diagrama do Desequilíbrio de ligação entre os blocos haplotípicos do gene *CYP5A1*.
Dentro de cada quadrado do diagrama está representado o valor de r^2 .

Figura 3. Diagrama do Desequilíbrio de ligação entre os blocos haplotípicos do gene *CYP2C19*. Dentro de cada quadrado do diagrama está representado o valor de r^2 .

Para melhor representar à hipótese da associação destes SNPs e Blocos haplotípicos com a resposta ao clopidogrel e definir o risco associado à presença de alterações gênicas com a sua resposta, foi realizado o estudo de regressão logística, através do programa *SNPator*, com distintos modelos de herança (recessiva, dominante, codominante, aditiva, alélica e haplotípicas, Tabelas 11), somente das associações que apresentaram significantes após os teste de correção por permutações. As alterações identificadas através da plataforma de análise *SNPator* foram ajustadas com a inclusão das covariáveis encontradas como significativamente diferentes em cada grupo (Tabela 1) neste novo modelo (TUDC; TUDA; Fumantes; Hipertensão; Diabetes e ARU).

Tabela 10. Resultados da análise de regressão logística utilizando como variável dependente a resposta ao clopidogrel nos distintos modelos de herança, alélica e haplotípica para os SNPs estudados.

Modelo de Herança	Gene	Código	Referencia	O.R.	IC 95%	p
Recessiva	<i>CYP2C19</i>	rs4244285	AA+AG	3,23	1,71-6,07	<0,001
	<i>CYP5A1</i>	rs2299890	GG	2,19	1,33-3,60	0,002
Codominante	<i>CYP2C19</i>	rs3758580	CT	3,74	1,87-7,46	<0,001
	<i>CYP2C19</i>	rs4244285	AG	3,21	1,68-6,16	<0,001
Dominante	<i>CYP2C19</i>	rs3758580	CT+TT	3,71	1,90-7,23	<0,001
	<i>CYP5A1</i>	rs2299890	AG+GG	2,30	1,26-4,20	0,007
Aditiva	<i>CYP2C19</i>	rs3758580	CT	3,80	1,90-7,60	<0,001
	<i>CYP5A1</i>	rs2299890	GG	3,22	1,64-6,35	<0,001
Alélica	<i>CYP5A1</i>	rs2299890	G	1,89	1,35-2,64	<0,001
	<i>CYP2C19</i>	rs3758580	T	3,14	1,69-5,81	<0,001
	<i>CYP2C19</i>	rs4244285	A	2,78	1,55-4,97	<0,001
Haplotípicas	<i>CYP2C19</i>	H5	GACGGC	2,37	1,39-4,03	0,001

O teste de regressão foi realizado utilizando a plataforma *SNPator*, com modelo de herança recessiva (AA+AB/AA), codominante (AA+BB/AB), dominante (AB+BB/AA), aditiva (AA/AB/BB), alélica (A/B) e haplotípicas, ajustando a análise incluindo como covariáveis: TUDC; TUDA; hábito de fumar; Hipertensão; diabetes e ARU. *O.R.*, *Odds Ratio*; IC95%, intervalo de confiança 95%; *p*, valor de *p*.

Os genes *CYP5A1* e *CYP2C19* apresentaram alterações com significativa associação com a resposta ao clopidogrel ($p < 0,010$), na análise de risco através do estudo de regressão logística multivariada. As alterações que se destacaram foram as dos genes *CYP2C19* e *CYP5A1*, (rs4244285 e rs2299890, modelo de herança recessiva) com *O.R.* 3,23 e 2,19 respectivamente; para o gene *CYP2C19* (rs3758580 e rs4244285, modelo de herança codominante) com *O.R.* 3,74 e 3,21 respectivamente; para o gene *CYP2C19* e *CYP5A1*, (rs3758580 e rs2299890, modelo de herança dominante) com *O.R.* 3,71 e 2,30 respectivamente; para o gene *CYP2C19* e *CYP5A1*, (rs3758580 e rs2299890, modelo de herança aditiva) com *O.R.* 3,80 e 3,22 respectivamente.

As alterações dos genes *CYP5A1* (rs2299890) e *CYP2C19* (rs3758580 e rs4244285) também apresentaram relações significantes com a resposta ao clopidogrel no modelo alélico de associação

com valores de *O.R.* 1,89; 3,14; e 2,78 respectivamente. Como também, a análise da associação dos blocos haplotípicos, utilizando a plataforma *SNPator*, apresentou associação com o genes *CYP2C19* (H5 GACGGC) com o valor de *O.R.* 2,37. Curiosamente este bloco haplotípico formado foi distinto do associado através da análise utilizando o programa estatístico *Haploview*.

4.3.2. Associação dos SNPs e Haplótipos com a resposta ao AAS

A análise da associação gênica com a resposta ao AAS utilizou-se como critério de classificação de pacientes respondedores e não respondedores, o valor de corte para ARU igual a 550, como descrito no item 3.3. Foi possível estabelecer com o teste de Qui-quadrado a associação da resposta com as alterações dos genes *COMT* (rs9605030) e *ITGB3* (rs12600865) (Tabela 12), assim como a associação do bloco haplotípico para o gene *COMT* (bloco 1 CTTG) (Tabela 13; Figura 3). Entretanto nenhuma destas associações obteve um valor de *p* significativo após a correção por permutação utilizando o programa *Haploview*.

Tabela 11. Associação dos SNPs com a resposta ao AAS com o teste de Qui-quadrado.

Gene	Código	Alelo Associado	Frequência	<i>p</i>
<i>COMT</i>	rs9605030	C	0,939:0,810	0.009
<i>ITGB3</i>	rs12600865	T	0,409:0,258	0,009

Teste realizado com valor de corte para pacientes respondedor < 550 ARU. Somente estão representadas as associações com *p* < 0,010. *p*, valor de *p*.

Tabela 12.. Associação dos blocos haplotípicos com a resposta ao AAS

Gene	Bloco	Haplótipo	Frequência	<i>p</i>
<i>COMT</i>	Bloco 1 : CTTG	0,177	0,061:0,191	0,009

Teste realizado com valor de corte para pacientes respondedor < 550 ARU. Somente estão representadas as associações com *p* < 0,010. *p*, valor de *p*.

Figura 4. Diagrama do Desequilíbrio de ligação entre os blocos haplotípicos do gene *COMT*.

Dentro de cada quadrado do diagrama está representado o valor de r^2 .

Na tabela 14 estão descritos os resultados da regressão logística da associação dos SNPs com a resposta ao AAS. A idade e sexo dos pacientes foram utilizados como covariáveis no modelo de regressão multivariada. Mais uma vez o gene *COMT* foi associado com a resposta ao AAS somente no modelo de herança codominante com valores de *O.R.* 3,23 (IC95%,1,42-7,34), não encontrando significância para os outros modelos de herança e associações para os blocos haplotípicos formados, tanto para o gene *COMT* quanto para o gene *ITGB3* utilizando a plataforma de análise *SNPator*.

Tabela 13. Regressão logística utilizando como variável dependente a resposta ao AAS, no modelo de herança codominante para os SNPs estudados.

Gene	Código	Referencia	O.R.	IC 95%	<i>p</i>
<i>COMT</i>	rs174674	AG	3,23	1,42-7,34	<0,01

O teste de regressão foi realizado utilizando a plataforma *SNPator*, com modelo de herança codominante (AA+BB/AB), ajustando a análise incluindo como covariável a idade e sexo dos pacientes. *O.R.*, *Odds Ratio*; IC 95%, intervalo de confiança 95%; *p*, valor de *p*.

4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.4.1. Microarranjos de DNA

Os resultados da análise de expressão de RNAm das células do sangue periférico foram distintas das que foram utilizadas para o estudo de associação dos SNPs. A justificativa para essa decisão foi: seguir critérios mínimos de análise de microarranjo descritos no item 3.1.2.; e o número limitado de indivíduos voluntários selecionados. Dessa forma optou-se por classificar os indivíduos deste grupo em relação a uma distribuição por quartil de resposta para o clopidogrel e para o AAS apresentados nas Tabelas 20 e 21, respectivamente. Nesta nova classificação observa-se que as variáveis como idade, tempo desde última dose de clopidogrel (TUDC), tempo desde a última dose de AAS (TUDA), hábito de fumar, histórico familiar, hipertensão, diabetes e dislipidemia, não há diferenças significativas entre os quartis, tanto para a classificação de resposta ao clopidogrel quanto para a resposta ao AAS.

Tabela 14. Dados demográficos e características clínicas dos pacientes subdivididos por quartil de resposta ao AAS.

	Quartil de resposta ao AAS (ARU)					<i>p</i>
	Total (26)	Q1 (6)	Q2 (7)	Q3 (7)	Q4 (6)	
ARU, unidades	413 (392-452)	383 (380-390)	400 (392-409)	423 (421-446)	498 (474-539)	
Idade, anos	60 (56-66)	63 (58-67)	56 (54-65)	56 (43-68)	63 (58-66)	0,937
TUDA, h	19 (4-19)	18 (3-19)	19 (4-19)	4 (2-19)	19 (19-19)	0,485
Fumantes	19 (5)	0 (0)	14 (1)	57 (4)	0 (0)	1,000
H. Familiar	12 (3)	0 (0)	14 (4)	0 (0)	33 (2)	0,121
Hipertensão	62 (16)	83 (5)	43 (3)	43 (3)	83 (5)	1,000
Diabetes	27 (7)	33 (2)	29 (2)	29 (9)	17 (1)	0,505
Dislipidemia	88 (23)	83 (5)	100 (7)	86 (6)	83 (5)	1,000
IMC, Kg/m ²	29 (27-30)	29 (25-29)	29 (28-32)	31 (28-32)	28 (27-29)	0,937

Os dados são apresentados em mediana (Percentil 25% – Percentil 75%) ou porcentagem (números de pacientes). O valor de *p* foi determinado pelo teste de Mann-Whitney ou teste de Qui-quadrado entre o primeiro quartil (Q1) e o quarto quartil (Q4) de resposta ao clopidogrel (ARU). H. familiar, Histórico familiar; ARU, *aspirin reaction units*; IMC, índice de massa corporal; TUDA, tempo desde ultima dose de AAS

Tabela 15. Dados demográficos e características clínicas dos pacientes subdivididos por quartil de resposta ao clopidogrel.

	Quartil de resposta ao clopidogrel (PRU)					<i>p</i>
	Total (26)	Q1 (6)	Q2 (7)	Q3 (7)	Q4 (6)	
PRU, unidades	212 (153-251)	138 (113-146)	190 (176-198)	246 (237-249)	287 (265-333)	
Idade, anos	60 (56-66)	59 (43-60)	65 (56-67)	58 (53-65)	61 (56-68)	0,699
TUDC, h	10 (2-19)	3 (2-19)	19 (9-20)	3 (2-4)	19 (12-19)	0,310
Fumantes	19 (5)	33 (2)	29 (2)	0 (0)	17 (1)	0,505
H. Familiar	12 (3)	17 (1)	0 (0)	29 (2)	0 (0)	0,296
Hipertensão	62 (16)	67 (4)	57 (4)	71 (5)	50 (3)	0,558
Diabetes	27 (7)	0 (0)	43 (3)	14 (1)	50 (3)	0,046
Dislipidemia	88 (23)	100 (6)	71 (5)	86 (6)	100 (6)	1,000
IMC, Kg/m ²	29 (27-30)	28 (27-29)	28 (25-29)	29 (29-32)	29 (27-31)	0,699

Os dados são apresentados em mediana (Percentil 25% – Percentil 75%) ou porcentagem (números de pacientes). O valor de *p* foi determinado pelo teste de Mann-Whitney ou teste de Qui-quadrado entre o primeiro quartil (Q1) e o quarto quartil (Q4) de resposta ao clopidogrel (PRU). H. familiar, Histórico familiar; PRU, *P2RY12 reaction units*; IMC, índice de massa corporal; TUDC, tempo desde ultima dose de clopidogrel.

Após as etapas de normalização e sumarização dos dados utilizando o programa *Partek® Genomics Suíte* (Partek Incorporated, Co., St. Louis, EUA) foi selecionado uma lista de genes diferentemente expressos entre o quartil 1 (respondedores) e o quartil 4 (não respondedores) tanto para a resposta ao AAS quanto para o clopidogrel, através do teste estatístico ANOVA com contraste considerando um *p* significativo <0,001 e um FC (*fold-change*) maior que $\pm 1,2$ (Anexo 3 e 4, respectivamente).

Com esses genes identificados como diferentemente expressos, foi realizada a análise de componentes principais (PCA), com o objetivo de visualizar a distribuição dos grupos de respondedores (quartis) em relação aos genes diferentemente expressos através das análises por microarranjo de DNA (Figura 4 e 5). Nestes gráficos foi possível observar a segregação entre os grupos de resposta, principalmente entre os quartis Q1 e Q4 para clopidogrel e AAS, demonstrando que a expressão gênica foi capaz de caracterizar os grupos de resposta.

Figura 5. Representação da análise de componentes principais, gerados com a lista de genes identificados como diferentemente expressos em relação à resposta do AAS, subdividido em quartil. Esferas vermelhas, Q4; esferas verdes, Q3; esferas azuis, Q2; e esferas roxas, Q1.

Figura 6. Representação da análise de componentes principais, gerados com a lista de genes identificados como diferentemente expressos em relação à resposta do clopidogrel, subdividido em quartil. Esferas vermelhas, Q4; esferas verdes, Q3; esferas azuis, Q2; e esferas roxas, Q1.

Com o objetivo de auxiliar na análise e interpretação funcional dos dados obtidos com o microarranjo de DNA, utilizou-se o programa *Ingenuity Pathways Analysis 6* (Ingenuity® Systems, Ca., Redwood City, EUA). Assim, foi possível identificar quais vias se relacionam com os genes identificados, restringindo o número de genes a ser validados pela PCR em tempo real (validação técnica) como também, obter informações importantes de outros genes relacionados com as vias observadas (Figura 6 e 7).

Destaca-se nove genes relacionados com o fator de transcrição *HNF4A*, como os genes *MBP* e *SULT1A1* com expressão significativamente diminuída e os genes *MKRN1*, *UBE2F*, *TFDP2*, *ABCC3*, *NOP56*, *CA2* e *STI3* com expressão aumentada no grupo não respondedor em relação aos respondedores ($p < 0,001$). Estes genes foram selecionados por estarem associados aos genes *CYP2C9* e *CYP2B6*, que por sua vez, estão envolvidos diretamente ou indiretamente com genes responsáveis pela farmacocinética (*CES1*) e farmacodinâmica do clopidogrel (*P2RY12*) (Figura 6).

A rede gênica relacionada à resposta ao AAS apresenta um maior número de genes diferentemente expressos (17) e associados a ela (Figura 7). Destacam-se quatro principais genes, descritos como genes centrais por apresentar maior convergência de genes associados a ele, que são: *HNF1A*, *IL1A*, *NFkB* e *TP53*.

O fator de transcrição *HNF1A* está relacionado com os genes *UGT2B7*, *SNX17* e *NF1A* com expressão significativamente diminuída e os genes *PAFAH1B2*, *RSF1* e *IGF1R* com expressão aumentada no grupo não respondedor em relação ao controle ($p < 0,001$). Este último gene se liga ao *PTGS1* e 2, alvos principais da ação do AS, que por sua vez, está associado ao segundo gene central desta via, o gene *IL1A*.

A expressão diminuída do gene *IL1A* está presente juntamente com a diminuição da expressão de *IK* e *IL2RA* e o aumento de *CCL8*, *UGT* e *UGT2B1* ($p < 0,001$). Além disso, *IL1A* está associado a outro gene central da rede, o gene *TP53*, que por sua vez, também está ligado ao aumento de expressão do gene *IGF1R* envolvido com o gene central *HNF1A*. Por fim, *TP53* também está associado à expressão diminuída de *ENG* e *CENPE* e aumentada de *HSPA1A* e *SNP23*. E o gene *IL2RA* ao gene central desta via, o gene *NFkB*.

Figura 7. Representação da rede de relacionamento entre os genes encontrados na análise de expressão diferencial de RNAm utilizando no microarranjo de DNA em resposta ao clopidogrel. As linhas cheias representam relações estabelecidas diretamente; linhas pontilhadas relações indiretas; cores verdes, genes com expressão aumentada nos pacientes pertencentes ao Q4 (pior resposta); cores vermelhar, genes com expressão diminuída nos pacientes pertencentes ao Q4 (pior resposta); sem cores, genes que fazem parte da via de relacionamento, mas não foram encontrados como diferentemente expressos; e nos balões as funções que estão relacionadas os genes neles conectados.

Figura 8. Representação da rede de relacionamento entre os genes encontrados na análise de expressão diferencial de RNAm utilizando no microarranjo de DNA em resposta ao AAS. As linhas cheias representam relações estabelecidas diretamente; linhas pontilhadas relações indiretas; cores verdes, genes com expressão aumentada nos pacientes pertencentes ao Q4 (não respondedor); cores vermelhar, genes com expressão diminuída nos pacientes pertencentes ao Q4 (não respondedores); sem cores, genes que fazem parte da via de relacionamento, mas não foram encontrados como diferentemente expressos; e nos balões as funções que estão relacionadas os genes neles conectados.

4.4.2. Validação técnica pela PCR em tempo real

Os genes selecionados para a validação técnica pela PCR em tempo real foram: *ABCC3*, *CA2*, *MBP*, *MKRN1*, *NOP56*, *ST13*, *SULT1A1*, *TFDP2* e *UBE2F* para a resposta ao clopidogrel e os genes *CCL8*, *ENG*, *IGF1R*, *IK*, *IL*, *IL1A*, *IL2RA*, *PAFAH1B2*, *RSF1*, *SNX17* e *UGT2B10* para a resposta ao AAS.

Os genes *UBE2F*, *TFDP2*, *SULT1A1*, *ST13*, *MKRN1*, *MBP*, *CA2* e *ABCC3* foram considerados validados para o clopidogrel e os genes *RSF1*, *NFIA*, *IL2RA*, *IL1A*, *IK*, *IGF1R* e *CCL8* para o AAS por apresentarem perfil de variação de expressão semelhante entre os resultados da PCR em tempo real e microarranjo de DNA (Figura 5).

De acordo com o critério de classificação de genes validados por correlação de Spearman observa-se correlação moderada a forte entre as técnicas para os genes *CA2*, *MKRN1*, *ABCC3* e *MBP* para o clopidogrel ($r \geq 0,42$; $p < 0,05$) e os genes *NFIA* e *IGF1R* para a resposta ao AAS ($r \geq 0,60$; $p < 0,05$; Tabela 22).

Figura 9. Comparação entre os valores de FC dos resultados do microarranjo de DNA (barras em azul) e da PCR em tempo real (barras em amarelo). AAS, ácido acetilsalicílico; FC, *fold-change*.

Tabela 16. Resultados de análise de correlação entre os resultados da PCR em tempo real e do microarranjo de DNA.

CLOPIDOGREL (n=26)			AAS (n=26)		
Gene	<i>r</i>	<i>p</i>	Gene	<i>r</i>	<i>p</i>
CA2	0,70	<0,01	NFIA	0,70	<0,01
MKRN1	0,70	<0,01	IGF1R	0,65	<0,01
ABCC3	0,66	<0,01	IL2RA	0,37	0,06
MBP	0,42	0,03	RSF1	0,35	0,08
SULT1A1	0,32	0,11	CCL8	0,31	0,13
UBE2F	0,10	0,61	IL1A	0,28	0,16
ST13	0,10	0,61	PAFAH1B2	0,19	0,35
NOP56	0,02	0,92	ENG	0,07	0,72
TFDP2	-0,03	0,88	UGT2B10	-0,10	0,64
			IK	-0,18	0,38
			SNX17	-0,32	0,11

Em negrito, estão representados os gene que obtiveram um valor de $p < 0,05$ e coeficiente de correlação (r) entre 0,4 a 0,7 para o teste de Spearman.

5. DISCUSSÃO

O controle terapêutico adequado depende de vários fatores que podem ser classificados didaticamente em intrínsecos e extrínsecos (ZUERN, C. S. et al., 2010). Para muitos fármacos utilizados na terapêutica existe uma grande dificuldade de se estabelecer estes fatores, seja por falta de conhecimento, seja por falta de recursos técnicos científicos de diversas Instituições. Por mais favoráveis que sejam a demonstração dos resultados das pesquisas no meio científico, pouco se aplica na clínica diária, seja por divulgação por meios não acessíveis aos clínicos, seja por falta de interesse desses no seu aprimoramento e melhoria científica.

Os avanços obtidos após a conclusão dos projetos, genoma humano, farmacogenômico, e mais recentemente do projeto dos 1000 genomas, pouco se utiliza na prática os conhecimentos gerados no meio médico, principalmente no Brasil (LANDER et al., 2001; PATTERSON, 2011; VENTER et al., 2001). Vários estudos clínicos foram realizados e publicados com resultados interessantes e de cunho prático importante, entretanto existe certa resistência para a transição dos resultados gerados por estes grandes estudos para a prática clínica.

No presente estudo, foi proposto estabelecer um vínculo mais íntimo entre a pesquisa básica com o trabalho rotineiro de um procedimento médico efetivo e com uso cada vez mais popular e de importância em saúde pública, devido ao custo benefício muito eficaz, ou seja, o tratamento da síndrome coronariana aguda, representando principalmente pelo infarto agudo do miocárdio, por procedimento de implante de *stent* seja convencionais ou farmacológicos. Este procedimento tem como principal risco ao paciente a ocorrência da reestenose e no local da colocação do dispositivo responsável pela recuperação da irrigação sanguínea (DANGAS et al., 2010).

De forma bem efetiva, o uso farmacológico combinado de AAS e de clopidogrel, dois potentes antiagregantes plaquetários, tem mostrado bons resultados, reduzindo significativamente eventos indesejáveis, entretanto ainda uma porcentagem significativa de pacientes que utilizaram deste recurso ainda sofre reestenoses, uma das principais complicações do procedimento do implante de *stent* (MOHAMMAD et al., 2010). Desta maneira, procurando alcançar os melhores resultados deste procedimento no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pioneiro na implantação deste dispositivo, estabeleceu-se uma avaliação mais profunda para alcançar o máximo de eficácia com o mínimo de efeitos indesejáveis, introduzindo o estudo farmacogenômico nos pacientes submetidos à angioplastia sob tratamento prévio da inibição das duas vias de agregação plaquetária.

Dessa forma, a importância do estabelecimento prévio de pacientes respondedores ou não respondedores à inibição da agregação plaquetária por técnica fenotípica (teste de inibição da agregação) pós-tratamento farmacológico mostrou-se clara (MOHAMMAD et al., 2010). No

entanto, o estabelecimento de um valor de corte para a classificação dos pacientes em respondedores e não respondedores ao tratamento antiagregante tem sido difícil de ser estabelecida, pois existem diferentes métodos, assim como, distintos protocolos terapêuticos de administração destes medicamentos (ANGIOLILLO, DOMINICK J et al., 2009; BECKERATH, VON et al., 2007; LORDKIPANIDZÉ et al., 2007).

Cuisset e colaboradores (2010), avaliaram três diferentes métodos de determinação da resposta antiagregante especificamente ao clopidogrel, a saber: 1-) agregação plaquetária induzida pelo ADP; 2-) Índice de reatividade plaquetária *VASP-P*; e 3-) *VerifyNow*[®]. Estes métodos apresentaram uma boa correlação, mas uma concordância relativamente fraca para distinguir os indivíduos em respondedores e não respondedores, pelo fato de que para cada método foi proposto valores de corte distintos (CUISSET et al., 2010). No entanto é inevitável classificar os pacientes em pelo menos dois grupos (respondedor e não respondedor), para estabelecer uma relação entre as alterações gênicas (SNPs e expressão de RNA), a farmacocinética (quantificação dos metabólitos em plasma) com a resposta farmacológica (BROCKMÖLLER; TZVETKOV, 2008).

No presente estudo, quando utilizados os critérios de classificação definidos na metodologia para a resposta ao clopidogrel (%PRU < 30%), observou-se uma alta frequência de pacientes não respondedores (63%), quando comparada com outros estudos que utilizaram a mesma metodologia de determinação da resposta antiagregante para este medicamento, a exemplo do estudo de Malinin e colaboradores, que encontraram um valor para a frequência de não respondedores ao clopidogrel de 21% (MALININ et al., 2007). Esta diferença pode ser possivelmente explicada pela composição distintas das casuísticas, uma vez que, os fatores de risco associados às doenças cardiovasculares, como o hábito de fumar, diabetes, hipertensão e o tempo desde a última dose do medicamento podem influenciar na resposta ao clopidogrel (GIUSTI et al., 2010).

Os resultados obtidos destes fatores de risco, neste estudo apresentaram frequências esperadas para a população estudada, uma vez que todos pacientes tinham DAC, como já descritos por outro estudo (BROECKEL et al., 2002). A descrição detalhada das variáveis clínicas e como se distribuem no grupo respondedor e não respondedor foi importante para definição precisa de quais as variáveis clínicas deveriam ser utilizadas nas análises de alterações de sequências de DNA e de expressão gênica, para a minimização de possíveis interferentes.

Um claro exemplo foi os resultados obtidos do teste de regressão logística que apontou uma relação entre pacientes diabéticos e a resposta ao clopidogrel independentemente das outras variáveis clínicas pré-existent. Este achado pode ser explicado em parte, pelas alterações no metabolismo, aumento do estresse oxidativo e da disfunção endotelial que estão relacionados com

o mecanismo de aumento da reatividade plaquetária, neste grupo específico de pacientes, diminuindo a resposta da terapia antiagregantes (ANGIOLILLO; SURYADEVARA, 2009).

Por outro lado, quando se observam os valores para a frequência de não respondedor ao AAS, encontram-se valores mais próximos a outros estudos, como o estudo de Lordkipanidzé e colaboradores (2009) que encontraram frequência de 5,9% para pacientes não respondedores, embora estes autores utilizassem para a resposta ao AAS, valor limite de 525 e não 550 ARU (LORDKIPANIDZÉ et al., 2009). Em contra partida, não foi encontrada a mesma relação entre a variação na resposta antiagregante e as variáveis clínicas descritas para o clopidogrel, a não ser para a idade e sexo dos pacientes que também já foi descrita anteriormente por outro autor (ZUERN, et al., 2010).

Sabendo da importância da determinação das concentrações plasmáticas dos antiagregantes plaquetários, estabeleceu-se neste trabalho, um método sensível e reprodutível para essa finalidade que foi fundamental para validar os resultados deste estudo. Tornando possível validar as amostras dos pacientes em relação à aderência ao tratamento, estabelecendo valores plasmáticos para os metabolitos de cada fármaco, definindo de forma clara a eficácia terapêutica estabelecida para cada um dos medicamentos (SHIN, B. S.; YOO, 2007). Desta forma, a diminuição da ação farmacologia, derivada de um não comprimento da terapêutica proposta por parte do pacientes, poderia mascarar os resultados da relação entre as respostas farmacológicas e a presença de SNPs ou diferenças de expressão de RNAm.

Cabe ressaltar a importância da padronização e validação deste método ainda ausente na literatura, possibilitando avaliar a farmacocinética do clopidogrel, de seu metabolito majoritário e do AS em um único procedimento de extração, cromatografia e detecção, permitindo analisar a sua relação com o tempo da última dose ingerida dos medicamentos antiagregante. Esta versatilidade inerente ao método desenvolvido cria a possibilidade de sua inclusão na rotina laboratorial com mais uma ferramenta disponível ao corpo clínico de hospitais de grande porte.

Na literatura verifica-se apenas o trabalho de Kachhadia e colaboradores que descreveram um método de determinação conjunta de clopidogrel e de AAS, que teve como objetivo avaliar os produtos de degradação destas duas moléculas após diversas condições de armazenamento, entretanto este método apresentou uma baixa sensibilidade e não foi estabelecida para a quantificação dos metabólitos majoritários de ambos os medicamentos, dificultando sua aplicação em estudo clínico ou sua aplicação na rotina laboratorial (KACHHADIA et al., 2009).

Os resultados obtidos pelo método estabelecido neste estudo podem ser comparados por outros descritos de forma isolada (SOURI et al., 2006; YAMAMOTO, E. et al., 2007) o que

proporcionou uma avaliação comparativa nas concentrações plasmáticas. Sem dúvida, os resultados propiciaram interpretações importantes para estudos farmacocinéticos aqui analisados. No presente trabalho o tempo desde a última dose de administração dos medicamentos variou de 1 a 24 horas, o que justifica o grande desvio padrão encontrado para a determinação da concentração plasmática dos antiagregantes e seus metabólitos.

Os resultados mostraram uma relação significativa entre o tempo de ingestão da última dose de clopidogrel e a concentração do seu metabólito majoritário do clopidogrel. Tal fato indica uma variação não esperada na cinética de metabolização/excreção para um tratamento crônico (período superior a 5 dias), uma vez que, concentrações terapêuticas é alcançado com no mínimo três dias após a administração de uma dose diária de 75 mg (MULLANGI; SRINIVAS, 2009). Embora estudos demonstrem que o incremento da dose diária de 75 para 150 mg, aumenta a sua ação farmacológica (BECKERATH, VON et al., 2007), ou seja, acarretaria em uma maior taxa de inibição da agregação plaquetária, esta relação não foi observada no atual estudo, quando analisamos o efeito da concentração plasmática tanto do clopidogrel, do seu metabólito majoritário e AS. Embora, foi observado que os pacientes que possuem valores maiores para o tempo de administração desde ultima dose, possuem valores médios de concentrações dos metabólitos inferiores ao grupo de menor tempo de administração dos medicamentos.

Assim, após a descrição e análise crítica das possíveis interações entre as variáveis clínicas e analíticas referentes às concentrações dos medicamentos com a resposta farmacológica, o estudo de alteração genômica (SNPs) foi desenvolvido a partir da seleção de genes e SNPs candidatos. Possibilitando assim uma melhor aproximação para os estudos de associação gênica, aumentando a probabilidade de encontrar relações significativas entre as variáveis estudadas (JOO et al., 2005).

Referente à análise da variação da resposta do clopidogrel e a presença de SNPs nos genes selecionados, foram observadas novas alterações associadas a esta variação na resposta, por exemplo, no gene tromboxano A sintase 1 (*CYP5A1*), como também alterações já descritas, como no gene *CYP2C19* (GEISLER, TOBIAS et al., 2008; HARMSZE, A. et al., 2010; MEGA et al., 2010). Demonstrando que, tanto a casuística utilizada, quanto a classificação para a definição de pacientes respondedores e não respondedores ao clopidogrel de forma indireta, foi pertinente para a análise de SNPs.

A nova associação descrita neste estudo foi referente ao gene *CYP5A1*, que tem como função principal catalisar a conversão da prostaglandina H2 em tromboxano A2, sendo este um potente vasoconstritor e indutor da agregação plaquetária. Os SNPs deste gene foram caracterizados por Chevalier e colaboradores (2001), cuja descrição relata a presença de 11 alterações distribuídos

na região promotora, codificante e 3' não traduzida (CHEVALIER et al., 2001). Alguns autores relacionam a presença de SNPs neste gene com a suscetibilidade em desenvolver derrame (KIMOULI et al., 2009), infarto cerebral (PARK, S. A. et al., 2009) e câncer de mama (ABRAHAM et al., 2009).

Curiosamente, todos os novos SNPs descritos neste estudo para o gene *CYP5A1*, como significantemente associados à diminuição da resposta ao clopidogrel, estão presentes nas regiões transcritas do gene, mas não traduzidas. Estas alterações sozinhas ou formando blocos haplotípicos podem influenciar a via da formação do tromboxano A₂ estimulando ou não a agregação plaquetária, independentemente da utilização de medicamentos inibidores da agregação plaquetária (KIMOULI et al., 2009). Assim sendo, o mecanismo envolvido na falha terapêutica através da presença de SNP no gene *CYP5A1* pode ser independentes das vias de bloqueio da ativação plaquetária induzidas pelo clopidogrel ou AAS.

Por outro lado, as alterações no gene *CYP2C19* estão ligadas diretamente a farmacocinética do clopidogrel, sendo que, sua ação é essencial para a formação do metabólito ativo do clopidogrel, que atua como antagonista irreversível dos receptores *P2RY12*, inibindo esta via de sinalização e consequentemente, a ativação dos receptores GPIIb/IIIa, responsável direto pela agregação plaquetária através da sua ligação com o fibrinogênio (SANGKUHL et al., 2010). Todas as alterações encontradas no gene *CYP2C19* associadas à resposta farmacológica, estão inseridas na região codificante deste gene. Embora estas alterações sejam classificadas como alterações sinônimas, na qual existe uma troca de nucleotídeo, mas não gera a troca de aminoácido no processo de tradução, este tipo de mudança pode ter sua importância, uma vez que, esta troca pode influenciar na regulação deste processo, atuando na desestabilização do RNAm, como também, na região alvo de interação de miRNA (*microRNA*) (FICHTLSCHERER et al., 2010; SHASTRY, 2009).

Quando estudado os resultados da associação dos blocos haplotípicos formados pelos SNPs presentes em um determinado gene, e sua relação com a resposta ao clopidogrel, mais uma vez, o gene *CYP2C19* se destaca com um bloco formado por 6 SNPs, na qual temos incluídos dois SNPs descritos como associado de forma isolada (rs4222285 e rs3768680), juntamente com outros quatro SNPs (rs10786172, rs3758581, rs11597626 e rs15554474). Estes SNPs estão na sua maioria presentes em regiões intrônicas, a não ser pelo SNP rs3758581, que além de estar presente na região codificante do gene é classificado como SNP de alteração de sentido (*missense*), que descreve a troca do aminoácido isoleucina (apolar) pela valina (apolar). Embora os dois aminoácidos pertencerem à mesma classificação estrutural de aminoácidos apolares, esta troca pode acarretar em

alterações estruturais terciárias ou quartenárias, contribuindo tanto para falha de sua ação como também de sua estabilidade (GONZALES:COVARRUBIAS et al., 2007).

A mesma estratégia de análise foi utilizada para a busca de associação entre SNPs e blocos haplotípicos referente à resposta ao AAS. Entretanto na primeira aproximação, utilizando o programa *Haploview*, não foi possível determinar associação significativa quando utilizamos o teste de correção por permutação. No entanto, ao analisar a regressão logística do gene catecol-O-metiltransferase (*COMT*), observou-se associação deste com a resposta ao AAS. Alguns trabalhos sugerirem somente a existência da relação entre estas alterações com a variação da resposta terapêutica a diversos medicamentos antipsicótico e de distúrbios do comportamento (ABRAHAM et al., 2009; KERESZTURI et al., 2008). Assim, este é o primeiro trabalho que, relacionou a presença de SNPs no gene *COMT*, formando um bloco haplotípico, com a resposta ao AAS ($p < 0,010$).

Após a descrição de algumas alterações estruturais no DNA, que estão significativamente relacionadas com a resposta farmacológica dos antiagregantes plaquetários, a próxima etapa deste estudo farmacogenômico foi avaliar a relação entre a expressão global de RNAm com a resposta ao tratamento. Entretanto, umas das dificuldades inerentes a avaliação da expressão gênica diferencial é a existência da uma grande variabilidade biológica entre estes grupos contrastados (respondedor *versus* não respondedor). Assim sendo, a classificação dos pacientes para esta análise transcriptômica foi distinta ao utilizado para a análise genômica. Para isso, buscou-se equiparar os valores de frequências das variáveis clínicas e contrastar os extremos das diferenças de resposta ao tratamento. Dessa forma, optou-se em classificar os pacientes de acordo com quartil de resposta aos antiagregantes, a exemplo do trabalho de Patti e colaboradores (PATTI et al., 2008).

Os resultados deste trabalho demonstraram que a categorização dos pacientes em quartil de resposta foi a melhor aproximação para análise destes dados, em relação ao perfil de expressão global de RNAm, uma vez que, demonstra uma clara diferença entre os grupos de respondedores e não respondedores, tanto para o clopidogrel quanto para o AAS, sendo estes valores de resposta semelhantes a outros trabalhos da literatura (ANGIOLILLO et al., 2009; PATTI et al., 2008). Com relação as variáveis clínicas analisadas, as frequências embora não significantes, descrevem resultados similares a de fatores de risco descritos para a população estudada, igualmente para a casuística total deste trabalho (AVEZUM et al., 2005).

Entretanto, quando se analisa atentamente a distribuição deste fatores de risco em relação a resposta ao clopidogrel, observa-se que no seu quartil inferior de resposta (grupo de pacientes com melhor resposta ao clopidogrel) não foi encontrado nenhum paciente diabético, este fato, mesmo

não significativo, pode provavelmente esta relacionada com o aumento da reatividade plaquetária na situação de hiperglicemia, indicando uma relação clínica com diabetes e resposta antiagregante (ANGIOLILLO; SURYADEVARA, 2009).

Quando analisou-se os dados do microarranjos de DNA através da rede de relacionamento entre os genes identificados como diferentemente expressos, mais uma vez, a sutil relação com a diabetes foi observada, mas especificamente, quando se refere a rede do fator nuclear do hepatócito 4A (*HNF4A*), que tem suas variantes genéticas associadas a sua diminuição funcional ligada ao diabetes tipo MODY 1 (ANURADH et al., 2010). Este gene pertencente a uma família de receptores hormonais, na qual sua expressão majoritariamente se localizada no fígado e rim, tendo como função principal a atuação na coordenação de múltiplos genes relacionados à via da glicose, colesterol e metabolismo de ácidos graxos (LOVE;GREGORY; PERMUTT, 2007).

Um dos genes que tem sua expressão coordenada pelo *HNF4A*, com destaque nesta rede é o transportador de efluxo do tipo ABC da subfamília C membro 3 (*ABCC3*) encontrado significativamente expressos e validados pela PCR em tempo real com expressão aumentada nos indivíduos classificados como não respondedores, em comparação aos indivíduos respondedores ao clopidogrel. Lu e colaboradores (2010), descreveram que camundongos com a expressão bloqueada para o gene *HNF4A* demonstram uma perda na expressão de transportadores de efluxo no fígado, incluindo o gene *ABCC3*, quando comparados com camundongos normais (LU, et al., 2010).

Entretanto o mecanismo que envolve a modulação da expressão do *ABCC3* em leucócito não é clara. Bohan e colaboradores (2003) demonstraram que a indução da expressão de *ABCC3* exerce um efeito hepatoprotetor na colestase, sugerindo que sua transcrição seja regulada pelo receptor nuclear da subfamília 5 grupo A membro 2 (*NR5A2*), um fator de transcrição presentes nos hepatócitos, dependentemente da via de sinalização do fator de necrose tumoral alfa (*TNFalfa*) (BOHAN et al., 2003).

Por outro lado, a transcrição do *ABCC3* também pode ser modulada pela presença de uma alteração polimórfica de um único nucleotídeo contida na região promotora do seu gene denominada -211T>C, como demonstrada no modelo de transfecção recombinante de células HepG2, Caco-2 e LS174T (GRADHAND et al., 2007). Entretanto o exato mecanismo de como o polimorfismo estaria afetando a expressão de RNAm do gene *ABCC3* e, se realmente este gene pode ser um transportador de efluxo efetivo do clopidogrel, ainda carece de elucidações.

Outro gene ligado a mesma rede de relacionamento do *HNF4A* e que também foi validado pela PCR em tempo real, foi o gene Makorin anel dedo de zinco 1 (*MKRNI*), sendo sua função relacionada com o controle do processo transcricional dependente de RNA polimerase II

(OMWANCHA et al., 2006). A expressão elevada do gene *MKRN1* pode inibir a atividade do processo transcricional de receptores nucleares, como o *NHF4A*, de andrógenos e do ácido retinoico indicando um papel de co-modulador da expressão gênica (LEE et al., 2009).

Relacionado diretamente com o clopidogrel o gene *CYP2C9*, apesar de sua expressão não ser detectada com uma expressão diferencial entre os grupos respondedores e não respondedores ao clopidogrel, o *CYP2C19* foi associado ao gene *HNF4A* na rede de relacionameto estabelecida neste estudo. Sua ação está ligada a farmacocinética do clopidogrel sendo um dos principais responsáveis pela formação do seu metabólito ativo (SANGKUHL et al., 2010). Alterações no gene *CYP2C19* (rs1057910) foi descrita como associada ao aumento da reatividade plaquetária nos pacientes tratados com dupla antiagregação e submetidos ao procedimento de angioplastia coronária (HARMSZE et al., 2010a), como também está mesma alteração, foi associada em um estudo caso versus controle com o risco de trombose de *stent* após procedimento de angioplastia coronária (HARMSZE, A. et al., 2010).

O SNP rs1057910 foi caracterizado como uma alteração contida dentro da região codificante do gene denominado de sem sentido, na qual o aminoácido isoleucina é substituído por um aminoácido leucina, tal modificação está relacionada com a perda da atividade funcional deste gene, acarretando redução na metabolização do clopidogrel e consequentemente na diminuição do seu composto ativo (KING et al., 2004).

Quando analisou-se os resultados da rede de relacionamento dos genes diferentemente expressos entre os pacientes respondedores e não respondedores ao AAS, observou-se como um dos principais gene centrais desta rede, o fator nuclear de hepatócito 1A (*HNF1A*) que juntamente com o *HNF4A* (descrito anteriormente), se relaciona com diabetes tipo MODY 3 (AWA et al., 2011). Ligado a este fator nuclear do hepatócito encontra-se os dois genes validados tecnicamente pela PCR em tempo real, o primeiro denominado fator nuclear 1A (*NF1A*), que apresentou uma expressão de RNAm diminuída no grupo não respondedor, cuja função é de regular o processo de transcrição de genes como também da replicação de adenovirus (KING et al., 2004).

O gene do receptor do fator 1 semelhante a insulina (*IGF1R*), foi o segundo gene encontrado como diferentemente expresso, no entanto, a sua expressão foi caracterizada como aumentada nos pacientes não respondedores, ao contrario do *NF1A*. Este gene foi o principal representante desta rede de interações, uma vez que tanto o seu ligante o fator semelhante à insulina 1 (*IGF1*) quanto o próprio receptor já foram identificados em plaquetas (CHAN, 1998; KAREY; SIRBASKU, 1989), como também a sua expressão também já foi correlacionada tanto com o aumento do risco de

desenvolver a doença cardiovascular quanto ao aumento do risco de reestenose após procedimento de angioplastia coronária (FRYSTYK, 2002; FRYSTYK, 2004).

Hers (2007) demonstrou claramente que o *IGF1* potencializa a agregação plaquetária através do mecanismo via o receptor de IGF (*IGF1R*) juntamente com o 3-fosfoinositide quinase e o substrato do receptor de insulina (*IRS*), sendo este último, também regulado pelo *HNF1A* (HERS, 2007). Dessa forma, os dados do presente trabalho sugerem que a relação marcada entre o *IGRF* e a agregação plaquetária pode ser um sinal para falha terapêutica do AAS, uma vez que o aumento da expressão do *IGFRI* culmina em uma maior reatividade plaquetária destes pacientes.

6. CONCLUSÃO

- Foi possível associar os fatores de risco diabetes, hipertensão e hábito de fumar, com a falha na resposta antiagregante frente ao clopidogrel, como também associar o sexo feminino e com o aumento da idade para a resposta ao AAS.
- O método de quantificação simultânea dos principais metabolitos da terapêutica antiagregante mostrou-se sensível, reprodutível e dentro dos limites da aplicabilidade clínica, permitindo a sua utilização na rotina laboratorial, contribuindo para o entendimento da variação na resposta farmacológica.
- Houve a associação das alterações nos genes *CYP2C19* e *CYP5A1*, com a variação da resposta terapêutica ao clopidogrel, independentemente de outras variáveis. Como também, estabelecer a associação de um haplótipo do gene *COMT*, com a resposta ao AAS.
- A análise de microarranjos identificou genes diferentemente expressos em relação à resposta terapêutica antiagregante, a exemplo do gene *ABCC3* para a resposta ao clopidogrel e do gene *HNF1A* para a resposta ao AAS.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. E.; HARRINGTON, P.; DRIVER, K. E.; et al. Common polymorphisms in the prostaglandin pathway genes and their association with breast cancer susceptibility and survival. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 6, p. 2181-91, 2009.
- AK. Pharmacogenomics in clinical trials: An analysis. **Indian Journal of Medical**, p. 574-575, 2007.
- ANGIOLILLO, D. J.; SURYADEVARA, S. Aspirin and clopidogrel: efficacy and resistance in diabetes mellitus. **Best practice & research**, v. 23, n. 3, p. 375-88, 2009.
- ANGIOLILLO, DOMINICK J; SURYADEVARA, S.; CAPRANZANO, P.; et al. Antiplatelet drug response variability and the role of platelet function testing: a practical guide for interventional cardiologists. **Catheterization and cardiovascular interventions**, v. 73, n. 1, p. 1-14, 2009.
- ANURADH, S.; RADHA, V.; MOHAN, V. Association of novel variants in the hepatocyte nuclear factor 4A gene with maturity onset diabetes of the young and early onset type 2 diabetes. **Clinical genetics**, p. 1-9, 2010.
- ARAZI, S. S.; GENVIGIR, F. D. V.; WILLRICH, M. A. V.; et al. Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. **Clinica chimica acta**, v. 393, n. 2, p. 119-24, 2008.
- AVEZUM, Á.; PIEGAS, L. S.; PEREIRA, J. C. R. Risk Factors Associated With Acute Myocardial Infarction in the São Paulo Metropolitan Region . A Developed Region in a Developing Country. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, n. 3, p. 206-213, 2005.
- AWA, W. L.; THON, A.; RAILE, K.; et al. Genetic and clinical characteristics of patients with HNF1{alpha} gene variations from the German-Austrian DPV database. **European journal of endocrinology**, v. 0049, n. January, p. 1-26, 2011.
- BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-5, 2005.
- BECKERATH, N. VON; KASTRATI, A.; WIECZOREK, A.; et al. A double-blind, randomized study on platelet aggregation in patients treated with a daily dose of 150 or 75 mg of clopidogrel for 30 days. **European heart journal**, v. 28, n. 15, p. 1814-9, 2007.
- BLANN, A. D.; PRETORIUS, A. Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: two sides of the same coin, or two different coins? **Atherosclerosis**, v. 188, n. 1, p. 12-8, 2006.
- BOHAN, A.; CHEN, W.-S.; DENSON, L. A; HELD, M. A; BOYER, J. L. Tumor necrosis factor alpha-dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3(Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36688-98, 2003.
- BORGDORFF, P.; TANGELDER, G. J.; PAULUS, W. J. Cyclooxygenase-2 inhibitors enhance shear stress-induced platelet aggregation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 4, p. 817-23, 2006.

BROCKMÖLLER, J.; TZVETKOV, M. V. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. **European journal of clinical pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 133-57, 2008.

BROECKEL, U.; HENGSTENBERG, C.; MAYER, BJÖRN; et al. A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. **Nature genetics**, v. 30, n. 2, p. 210-4, 2002.

BUDAJ, A. Global patterns of use of antithrombotic and antiplatelet therapies in patients with acute coronary syndromes: insights from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). **American Heart Journal**, v. 146, n. 6, p. 999-1006, 2003.

BURCH, J. W.; STANFORD, N.; MAJERUS, P. W. Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. **The Journal of clinical investigation**, v. 61, n. 2, p. 314-9, 1978.

CATTANEO, M. Inherited platelet-based bleeding disorders. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, , n. v, p. 12871299-12871299, 2003.

CATTANEO, M. ADP receptors: inhibitory strategies for antiplatelet therapy. **Drug News Perspect**, v. 19, n. 5, p. 253–259, 2006.

CAVALI, S. A.; HIRATA, H.; SALAZAR, LUIS A; et al. Apolipoprotein B gene polymorphisms : prevalence and impact on serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. **Clinica Chimica Acta**, v. 302, p. 189-203, 2000.

CHAN, K. Megakaryocytes Endocytose Insulin-Like Growth Factor (IGF) I and IGF-Binding Protein-3: A Novel Mechanism Directing Them into Granules of Platelets. **Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 559-565, 1998.

CHATTERJEE, S. K.; ZETTER, B. R. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. **Future oncology**, v. 1, n. 1, p. 37-50, 2005.

CHEVALIER, D.; LO-GUIDICE, J. M.; SERGENT, E.; et al. Identification of genetic variants in the human thromboxane synthase gene (CYP5A1). **Mutation research**, v. 432, n. 3-4, p. 61-7, 2001.

COMMITTEE, C. S. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. **The Lancet**, v. 348, n. 9038, p. 1329-39, 1996.

CUISSET, T.; FRERE, C.; POYET, R.; et al. Clopidogrel response: head-to-head comparison of different platelet assays to identify clopidogrel non responder patients after coronary stenting. **Archives of cardiovascular diseases**, v. 103, n. 1, p. 39-45, 2010.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; CHAUDHURI, A.; MOHANTY, P.; GARG, R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. **Circulation**, v. 111, n. 11, p. 1448-54, 2005.

DANGAS, G. D.; CLAESSEN, B. E.; CAIXETA, A.; et al. In-stent restenosis in the drug-eluting stent era. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 23, p. 1897-907, 2010.

DEBEY, S.; ZANDER, T.; BRORS, B.; et al. A highly standardized, robust, and cost-effective method for genome-wide transcriptome analysis of peripheral blood applicable to large-scale clinical trials. **Genomics**, v. 87, n. 5, p. 653-64, 2006.

DOEVENDANS, P. A.; JUKEMA, W.; SPIERING, W.; DEFESCHE, J. C.; KASTELEIN, J. J. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. **International journal of cardiology**, v. 80, n. 2-3, p. 161-72, 2001.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-7, 2006.

EL DESOKY, E. S.; DERENDORF, H.; KLOTZ, U. Variability in response to cardiovascular drugs. **Current clinical pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 35-46, 2006.

FALK, E. Widespread targets for friendly fire in acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 110, n. 1, p. 4-6, 2004.

FARADAY, N.; BECKER, D. M.; BECKER, L. C. Pharmacogenomics of platelet responsiveness to aspirin. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 10, p. 1413-25, 2007.

FICHTLSCHERER, S.; DE ROSA, S.; FOX, H.; et al. Circulating MicroRNAs in Patients With Coronary Artery Disease. **Circulation Research**, 2010.

FIRBAS, C.; SILLER-MATULA, J. M.; JILMA, B. Targeting von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib receptor. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 8, n. 12, p. 1689-1701, 2010.

FONTANA, P.; REBER, G.; MOERLOOSE, P. DE. Assessing aspirin responsiveness using the Verify Now Aspirin assay. **Thrombosis research**, v. 121, n. 4, p. 581-2, 2008.

FORTI, N.; SALAZAR, L. A.; DIAMENT, J.; et al. Alterações genéticas e colesterolemia: recentes estudos brasileiros. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n. 5, p. 565-571, 2003.

FRYSTYK, J. Cardiovascular Disease and Insulin-Like Growth Factor I. **Circulation**, v. 106, n. 8, p. 893-895, 2002.

FRYSTYK, JAN. Free insulin-like growth factors -- measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. **Growth hormone & IGF research**, v. 14, n. 5, p. 337-75, 2004.

GEISLER, T.; GAWAZ, M. Variable Response to Clopidogrel in Patients with Coronary Artery Disease. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 33, n. 2, p. 196-202, 2007.

GEISLER, TOBIAS; SCHAEFFELER, E.; DIPPON, J.; et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 9, p. 1251-9, 2008.

- GELFAND, E. V.; CANNON, C P. Myocardial infarction: contemporary management strategies. **Journal of internal medicine**, v. 262, n. 1, p. 59-77, 2007.
- GIUSTI, B.; GORI, A.; MARCUCCI, R.; et al. Determinants to optimize response to clopidogrel in acute coronary syndrome. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 3, p. 33-50, 2010.
- GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis : The Road Ahead Review. , v. 104, p. 503-516, 2001.
- GOLDSTEIN, P.; WIEL, E. Management of prehospital thrombolytic therapy in ST-segment elevation acute coronary syndrome (< 12 hours). **Minerva anestesologica**, v. 71, n. 6, p. 297-302, 2005.
- GONZALES-COVARRUBIAS, V.; GHOSH, D.; LAKHMAN, S. S.; PENDYALA, L.; BIANCO, J. G. A functional Genetic Polymorphism on Human Carbonyl Reductase 1 (CBR1V88I) Impacts on Catalytic Activity and NADPH Binding Affinity. **Drug Metab Dispos**, v. 35, n. 6, p. 973-980, 2007.
- GRADHAND, U.; TEGUDE, H.; BURK, O.; et al. Functional analysis of the polymorphism - 211C>T in the regulatory region of the human ABCC3 gene. **Life Sciences**, v. 80, n. 16, p. 1490-1494, 2007.
- HANKEY, G. J.; EIKELBOOM, J. W. Aspirin resistance. **Lancet**, v. 367, n. 9510, p. 606-17, 2006.
- HARMSZE, A. M.; WERKUM, J. W. VAN; TEN BERG, JURRIËN M; et al. CYP2C19*2 and CYP2C9*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study. **European heart journal**, v. 31, n. 24, p. 3046-53, 2010.
- HARMSZE, A.; WERKUM, J. W. VAN; BOUMAN, H. J.; et al. Besides CYP2C19*2, the variant allele CYP2C9*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 20, n. 1, p. 18-25, 2010.
- HERS, I. Insulin-like growth factor-1 potentiates platelet activation via the IRS/PI3Kalpha pathway. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4243-52, 2007.
- HILL, J. M.; ZALOS, G.; HALCOX, J. P. J.; et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 7, p. 593-600, 2003.
- HIRATA, R.; SALAZA, L. A.; CAVALLI, SELMA A; et al. A method to detect the G894T polymorphism of the NOS3 gene. Clinical validation in familial hypercholesterolemia. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 40, n. 5, p. 436-40, 2002.
- HOGGART, C. J.; SHRIVER, M. D.; KITTLES, R. A.; CLAYTON, D. G.; MCKEIGUE, P. M. Design and analysis of admixture mapping studies. **American journal of human genetics**, v. 74, n. 5, p. 965-78, 2004.

HOSHINO, K.; HORIUCHI, H.; TADA, T.; et al. Clopidogrel resistance in Japanese patients scheduled for percutaneous coronary intervention. **Circulation journal**, v. 73, n. 2, p. 336-42, 2009.

HUANG, R. S.; DUAN, S.; SHUKLA, S. J.; et al. Identification of genetic variants contributing to cisplatin-induced cytotoxicity by use of a genomewide approach. **American journal of human genetics**, v. 81, n. 3, p. 427-37, 2007.

HÄGG, D. A.; JERNÅS, M.; WIKLUND, O.; et al. Expression profiling of macrophages from subjects with atherosclerosis to identify novel susceptibility genes. **International journal of molecular medicine**, v. 21, n. 6, p. 697-704, 2008.

JOO, J.; TIAN, X.; ZHENG, G.; LIN, J.-P.; GELLER, N. L. Selection of single-nucleotide polymorphisms in disease association data. **BMC genetics**, v. 6 Suppl 1, p. S93, 2005.

KACHHADIA, P. K.; DOSHI, A. S.; JOSHI, H. S. Validated Column High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Aspirin and Clopidogrel in Combined Tablets in the Presence of Degradation Products Formed Under ICH–Recommended Stress Conditions. **Drug Formulation and Clinical Methods**, p. 152-157, 2009.

KAREY, K. P.; SIRBASKU, D. A. Human platelet-derived mitogens. II. Subcellular localization of insulinlike growth factor I to the alpha-granule and release in response to thrombin. **Blood**, v. 74, n. 3, p. 1093-100, 1989.

KEELEY, E. C.; BOURA, J. A.; GRINES, C. L. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. **Lancet**, v. 361, n. 9351, p. 13-20, 2003.

KERESZTURI, E.; TARNOK, Z.; BOGNAR, E.; et al. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. **American journal of medical genetics**, v. 147B, n. 8, p. 1431-5, 2008.

KIMOULI, M.; GOURVAS, V.; KONSTANTOUDAKI, X.; et al. The effect of exon 12 polymorphism of the human thromboxane synthase (CYP5A1) gene in stroke patients. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 1, p. 30-35, 2009.

KING, B. P.; KHAN, T. I.; AITHAL, G. P.; KAMALI, F.; DALY, A. K. Upstream and coding region CYP2C9 polymorphisms: correlation with warfarin dose and metabolism. **Pharmacogenetics**, v. 14, n. 12, p. 813-22, 2004.

KOIZUMI, S. Application of DNA microarrays in occupational health research. **Journal of occupational health**, v. 46, n. 1, p. 20-5, 2004. .

KROUWER, J. S.; RABINOWITZ, R. How to improve estimates of imprecision. **Clinical chemistry**, v. 30, n. 2, p. 290-2, 1984.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LEE, E.-W.; LEE, M.-S.; CAMUS, S.; et al. Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. **The EMBO journal**, v. 28, n. 14, p. 2100-13, 2009.

LIBBY, P.; OKAMOTO, Y.; ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circulation journal**, v. 74, n. 2, p. 213-20, 2010.

LOPES, R. D. Antiplatelet agents in cardiovascular disease. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 31, n. 3, p. 306-9, 2011. .

LORDKIPANIDZÉ, M.; DIODATI, J. G.; SCHAMPAERT, E.; PALISAITIS, D. A; PHARAND, C. Prevalence of unresponsiveness to aspirin and/or clopidogrel in patients with stable coronary heart disease. **The American journal of cardiology**, v. 104, n. 9, p. 1189-93, 2009.

LORDKIPANIDZÉ, M.; PHARAND, C.; SCHAMPAERT, E.; et al. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. **European heart journal**, v. 28, n. 14, p. 1702-8, 2007.

LOVE-GREGORY, L.; PERMUTT, M. A. HNF4A genetic variants: role in diabetes. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 10, n. 4, p. 397-402, 2007.

LU, H.; GONZALEZ, F. J.; KLAASSEN, C. Alterations in Hepatic mRNA Expression of Phase II Enzymes and Xenobiotic Transporters after Targeted Disruption of Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha. **Toxicological sciences**, v. 118, n. 2, p. 380-390, 2010.

MACHADO, M. O.; HIRATA, MÁRIO H; BERTOLAMI, MARCELO C; HIRATA, ROSARIO D C. Apo B Gene Haplotype is Associated With Lipid Profile of Higher Risk for Coronary Heart Disease in Caucasian Brazilian Men. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 24, p. 19-24, 2001.

MAHLA, E.; ANTONINO, M. J.; TANTRY, U. S.; GURBEL, P. A. Point-of-care platelet function analysis ready for prime time? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 10, p. 857-9, 2009. American College of Cardiology Foundation.

MALININ, A.; POKOV, A.; SPERGLING, M.; et al. Monitoring platelet inhibition after clopidogrel with the VerifyNow-P2Y12(R) rapid analyzer: the VERIfy Thrombosis risk ASsessment (VERITAS) study. **Thrombosis research**, v. 119, n. 3, p. 277-84, 2007.

MARCOTTE, E.; SRIVASTAVA, L. K.; QUIUION, R. cDNA microarray and proteomic approaches in the study of brain diseases: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 100, n. 1, p. 63-74, 2003.

MEGA, J. L.; CLOSE, S. L.; WIVIOTT, S. D.; et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. **The Lancet**, v. 376, n. 9749, p. 1312-1319, 2010.

MOHAMMAD, R. A; GOLDBERG, T.; DORSCH, M. P.; CHENG, J. W. M. Antiplatelet therapy after placement of a drug-eluting stent: a review of efficacy and safety studies. **Clinical therapeutics**, v. 32, n. 14, p. 2265-81, 2010.

MONTALESCOT, G.; DABBOUS, O. H.; LIM, M. J.; FLATHER, M. D.; MEHTA, R. H. Relation of timing of cardiac catheterization to outcomes in patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction or unstable angina pectoris enrolled in the multinational global registry of acute coronary events. **The American journal of cardiology**, v. 95, n. 12, p. 1397-403, 2005.

MULLANGI, R.; SRINIVAS, N. R. Clopidogrel: review of bioanalytical methods, pharmacokinetics/pharmacodynamics, and update on recent trends in drug-drug interaction studies. **Biomedical chromatography**, v. 23, n. 1, p. 26-41, 2009.

NABEL, E. G. Cardiovascular disease. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 1, p. 60-72, 2003.

NAKAHATA, N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology & therapeutics**, v. 118, n. 1, p. 18-35, 2008.

NIELSEN, H. L.; KRISTENSEN, S. D.; THYGESEN, S. S.; et al. Aspirin response evaluated by the VerifyNow Aspirin System and light transmission aggregometry. **Thrombosis research**, v. 123, n. 2, p. 267-73, 2008.

NOE, L.; PEETERS, K.; IZZI, B.; VAN GEET, C.; FRESON, K. Regulators of Platelet cAMP Levels: Clinical and Therapeutic Implications. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 26, p. 2897-2905, 2010. Bentham Science Publishers.

OHWAKI, Y.; YAMANE, T.; ISHIMATSU, T.; WADA, M.; NAKASHIMA, K. Semi-micro column high-performance liquid chromatography with UV detection for quantification of aspirin and salicylic acid and its application to patients' sera administered with low-dose enteric-coated aspirin. **Biomedical Chromatography**, v. 224, p. 221-224, 2007.

OMWANCHA, J.; ZHOU, X.-F.; CHEN, S.-Y.; et al. Makorin RING finger protein 1 (MKRN1) has negative and positive effects on RNA polymerase II-dependent transcription. **Endocrine**, v. 29, n. 2, p. 363-73, 2006.

others. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 15, p. 1495, 2004. Mass Med Soc. .

OZDEMIR, V.; SHEAR, N. H.; KALOW, W. What will be the role of pharmacogenetics in evaluating drug safety and minimising adverse effects? **Drug safety**, v. 24, n. 2, p. 75-85, 2001.

PARK, S. A.; PARK, B. L.; PARK, J. H.; et al. Association of polymorphisms in thromboxane A2 receptor and thromboxane A synthase 1 with cerebral infarction in a Korean population. **BMB reports**, v. 42, n. 4, p. 200-5, 2009.

PATRIGNANI, P.; FILABOZZI, P.; PATRONO, C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. **The Journal of clinical investigation**, v. 69, n. 6, p. 1366-72, 1982.

PATTERSON, K. 1000 genomes: a World of variation. **Circulation research**, v. 108, n. 5, p. 534-6, 2011.

PATTI, G.; NUSCA, A.; MANGIACAPRA, F.; et al. Point-of-care measurement of clopidogrel responsiveness predicts clinical outcome in patients undergoing percutaneous coronary intervention results of the ARMYDA-PRO (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty-Platelet Reac. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 14, p. 1128-33, 2008.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 16-21, 2001.

R. Paraoxonase polymorphisms are associated with nitrate levels and vascular response in young adults with myocardial infarction. **Int J Atheroscler**, v. 3, n. 3, 2008.

RABELINK, T. J.; BOER, H. C. DE; KONING, E. J. P. DE; ZONNEVELD, A.-J. VAN. Endothelial progenitor cells: more than an inflammatory response? **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 5, p. 834-8, 2004.

RODRIGUES, A. C.; CURI, R.; BRITTO, L. R. G.; et al. Down-regulation of ABCB1 transporter by atorvastatin in a human hepatoma cell line and in human peripheral blood mononuclear cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1760, n. 12, p. 1866-73, 2006.

ROSELL, R.; FELIP, E.; PAZ-ARES, L. How could pharmacogenomics help improve patient survival? **Lung cancer**, v. 57 Suppl 2, p. S35-41, 2007.

SAKUMA, T.; HIRATA, ROSARIO D C; HIRATA, MARIO H. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 18, n. 6, p. 309-16, 2004.

SALAZAR, L A; CAVALLI, S A; HIRATA, M H; et al. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33, n. 11, p. 1301-4, 2000.

SALAZAR, L A; HIRATA, M H; FORTI, N; et al. Pvu II intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. **Clinica chimica acta**, v. 293, n. 1-2, p. 75-88, 2000.

SALAZAR, L A; HIRATA, M H; GIANNINI, S D; et al. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. **Clinica chimica acta**, v. 300, n. 1-2, p. 139-49, 2000.

SALAZAR, LUIS A; HIRATA, MARIO H; CAVALLI, S. A; et al. Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations. **Human mutation**, v. 19, n. 4, p. 462-3, 2002.

SAMANI, N. J.; SCI, F. M.; ERDMANN, J.; et al. UKPMC Funders Group Author Manuscript Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. **English Journal**, v. 357, n. 5, p. 443-453, 2009.

SANGKUH, K.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. Clopidogrel pathway. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 20, n. 7, p. 463-5, 2010.

SCHWARTZ, R.; BORISSOFF, J.; SPRONK, H. The Hemostatic System as a Modulator of Atherosclerosis. **New England Journal of**, 2011.

SHASTRY, B. S. SNPs: impact on gene function and phenotype. **Methods in molecular biology**, v. 578, p. 3-22, 2009.

SHIN, B. S.; YOO, S. D. Determination of clopidogrel in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 9, p. 883-889, 2007.

SILVA, E.; MINUZZO, L.; PEREIRA, M. P.; et al. Artigo Original registro de Síndrome Coronariana Aguda em um Centro de Emergências em Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. 597-602, 2006.

SIMON, R.; WANG, S.-J. Use of genomic signatures in therapeutics development in oncology and other diseases. **The pharmacogenomics journal**, v. 6, n. 3, p. 166-73, 2006.

SORKIN, S. C.; FORESTIERO, F. J.; HIRATA, MARIO H; et al. APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 43, n. 12, p. 1339-1345, 2005.

SOURI, E.; JALALIZADEH, H.; KEBRIAEE-ZADEH, A.; SHEKARCHI, M.; DALVANDI, A. Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 1314, p. 1309-1314, 2006.

SUAREZ-KURTZ, G. Pharmacogenomics in admixed populations. **Trends in pharmacological sciences**, v. 26, n. 4, p. 196-201, 2005.

TANG, Y.; NEE, A. C.; LU, A.; RAN, R.; SHARP, F. R. Blood genomic expression profile for neuronal injury. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 23, n. 3, p. 310-9, 2003.

TAVARES, V.; HIRATA, R D C; RODRIGUES, A C.; et al. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 7, n. 5, p. 605-11, 2005.

TAVARES, V.; HIRATA, R D C; RODRIGUES, A C.; et al. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma C161T polymorphism on lipid profile in Brazilian patients with Type 2 diabetes mellitus. **Journal of endocrinological investigation**, v. 28, n. 2, p. 129-36, 2005.

TOTANI, L.; EVANGELISTA, V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 12, p. 2357, 2010.

TRENK, D.; HOCHHOLZER, W.; FROMM, M. F.; et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 20, p. 1925-34, 2008.

TUOMISTO, T. T.; YLÄ-HERTTUALA, S. What have we learnt about microarray analyses of atherogenesis? **Current opinion in lipidology**, v. 16, n. 2, p. 201-5, 2005.

TZOUVELEKIS, A.; PATLAKAS, G.; BOUROS, D. Application of microarray technology in pulmonary diseases. **Respiratory research**, v. 5, p. 26, 2004.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; et al. The sequence of the human genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5507, p. 1304-51, 2001.

WAEHRE, T.; DAMÅS, J. K.; PEDERSEN, T. M.; et al. Clopidogrel increases expression of chemokines in peripheral blood mononuclear cells in patients with coronary artery disease: results of a double-blind placebo-controlled study. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 4, n. 10, p. 2140-7, 2006.

YAMAMOTO, E.; TAKAKUWA, S.; KATO, T.; ASAKAWA, N. Sensitive determination of aspirin and its metabolites in plasma by LC-UV using on-line solid-phase extraction with methylcellulose-immobilized anion-exchange restricted access media. **Journal of chromatography. B**, v. 846, n. 1-2, p. 132-8, 2007.

YOON, Y.-S.; LEE, N.; SCADOVA, H. Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. **Biology of the cell**, v. 97, n. 4, p. 253-63, 2005.

YUSUF, S.; ZHAO, F.; MEHTA, S.; et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 7, p. 494, 2001.

ZUERN, C. S.; SHWAB, M.; GAEAZ, M.; GEISLER, T. Platelet pharmacogenomics. **J Thromb Haemost**, v. 8, n. 6, p. 1147-1158, 2010.

ANEXO 1. CEP DANTE PAZZANESE

DATA DA ENTRADA: 31 de março de 2009.

DATA DA AVALIAÇÃO: 07 de abril de 2009.

CAAE: 0020.0.131.018-09

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 3779

(este nº deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Investigador: Dr. Mario Hiroyuki Hirata

Nº de Sujeitos no Centro: 82

Nº de Sujeitos no Brasil: 82

Nº de Sujeitos Total: 82

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde – Farmácia – Diag.

Área Temática Especial: Genética Humana, Pesquisa com Cooperação Estrangeira

Fase: Não se aplica

Duração do Estudo: 4 anos

Pesquisa Vinculada: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Grupo: I

Projeto de Pesquisa: “Análise Farmacogenômica Pós-Infarto Agudo do Miocárdio em Pacientes com Dupla Antiagregação e Indicação para Implantação de Stent”

Considerações/Comentários: O objetivo geral do presente projeto consiste em realizar um estudo farmacogenômico pós-infarto agudo do miocárdio em pacientes que tem dupla terapia antiagregante e indicação para ACTP.

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

- a) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

- Protocolo de Pesquisa Clínica – Aprovado
- Cronograma de Atividades - Entregue
- Folha de Rosto – Entregue
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado
- Orçamento – Entregue
- Presupuesto Servicios Affymetrix – Universidade de Santiago de Compostela – Entregue
- Identificação do Auxílio Financeiro – Universidade de São Paulo – Entregue

Comitê de Ética
em Pesquisa

- Termo de Responsabilidade – Universidade de São Paulo – Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata – Entregue
- Carta de Encaminhamento do Projeto ao CEP – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Universidade de São Paulo – Profa.Assoc.Rosário D.C. Hirata – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Universidade de São Paulo – André Ducati Luchessi – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Universidade de São Paulo – Vivian Nogueira Silbiger – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Universidade de São Paulo – Lídio Gonçalves Lima Neto – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Universidade de São Paulo – Carla P. Pastorelli – Entregue
- Declaração da Universidade de Santiago de Compostela, datada de 30 de outubro de 2008 – Fdo.Prof.Angel Carracedo – Diretor do Instituto de Medicina Legal
- Declaração da Universidade de Santiago de Compostela, datada de 30 de outubro de 2008 – Dra.Maria Brión – Coordenadora do grupo de Genética de enfermidades – Entregue
- Declaração da Universidade de Santiago de Compostela, datada de 20 de outubro de 2008 – Fdo. Oscar Quintela Jorge - Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Profa. Dra. Amanda Guerra de Moraes R. Sousa – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Dr.Dikran Armaganijan – Entregue

Comitê de Ética em Pesquisa

- Declaração de Realização do Estudo – Dr.Marcelo F. Sampaio – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Dr.Álvaro Avezum – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo – Profa. Tit. Ana Campa – Entregue
- Declaração de Tornar Público os Resultados – Entregue
- Declaração de Currículo na Plataforma Lattes – Prof. Tit. Mario Hirata/ Profa. Assoc. Rosário Hirata/ André D. Luchessi/ Lídio G. Neto/ Carla Pastorelli/ Dra. Amanda Guerra de Moraes Souza/ Dr.Marcelo Sampaio/ Dr. Álvaro Avezum e Dr. Dikran Armaganijan – Entregue
- Justificativa – Universidade de São Paulo – Prof. Titular Mario Hirata – Entregue
- Lista de Centros Participantes – Entregue
- Declaração de uso do material somente para fins previstos – Prof. Titular Mario Hirata – Entregue
- CD com toda a documentação do projeto - Entregue

O Comitê de Ética em Pesquisa, solicita que:

- a. Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido
- b. Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE.
- c. Elaborar e apresentar ao CEP os relatórios parcial e final sobre a pesquisa.

ANEXO 2. CEP FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CE/FCF/88/2009
Protocolo CEP/FCF/505
CAAE 0020.0.131.018-09

I- Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Análise Farmacogenômica pós-infarto agudo do miocárdio em pacientes com dupla antiagregação e indicação para implantação de stent
Pesquisador Responsável:	Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Área Temática Especial:	Genética Humana
Patrocinadores:	FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo:

O projeto pretende contribuir ao entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos com a resistência a ação de antiagregantes plaquetários. Para tanto serão avaliados 82 pacientes portadores de infarto agudo do miocárdio com indicação de revascularização percutânea com angioplastia coronária e implante de stent previamente submetidos a tratamento prévio de dupla antiagregação com ácido acetil salicílico e bissulfato de clopidogrel. Amostras de sangue dos pacientes (31,5 mL no total) serão obtidas por punção da veia antecubital. Serão realizadas as seguintes análises: determinação da função plaquetária, determinação da concentração plasmática dos antiagregantes, análise de expressão gênica diferencial por microarranjos e por PCR em tempo real, determinação de polimorfismos de um único nucleotídeo, determinações bioquímicas (glicose, colesterol total e frações, uréia, creatinina, ácido úrico, troponina, ALT, AST, PAI-1, fibrinogênio, produtos de degradação da fibrina, proteína C reativa, troponina, CK, CK-MB, VLDL e LDL) e leucograma.

Os objetivos do presente estudo são:

Objetivo Geral

O objetivo geral do presente projeto consiste em realizar um estudo farmacogenômico pós-infarto agudo do miocárdio em pacientes que tem dupla terapia antiagregante e indicação para ACTP.

Objetivos específicos

- Avaliar a resposta ao tratamento com os antiagregantes bissulfato de clopidogrel e ácido acetilsalicílico, utilizando o sistema *Verify now Accumetrix* através da medida qualitativa da disfunção plaquetária em pacientes pós-infarto agudo do miocárdio.
- Determinar as concentrações plasmáticas dos antiagregantes bissulfato de clopidogrel e ácido acetilsalicílico por LC-MS em pacientes sob tratamento com doses de 75 e 100mg, respectivamente, no momento da determinação da resposta ao tratamento.

Página 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

- Avaliar o efeito dos antiagregantes no perfil de expressão gênica global, e suas variantes de *splicing*, dos leucócitos do sangue periférico utilizando a plataforma *Affymetrix Exon Array ST 1.0*.
- Estudar a relação existente entre os perfis de expressão gênica e polimorfismos presentes em genes envolvidos na biotransformação do bissulfato de clopidogrel e do ácido acetilsalicílico através do sistema de genotipagem *SNPlex*.
- Avaliar as correlações entre: expressão gênica, presença de SNPs, inibição da agregação plaquetária e concentrações dos antiagregantes.

Tipo de estudo: Transversal

Descrição da Casuística:

Farão parte do estudo 82 pacientes, do sexo masculino com idade entre 30 e 80 anos. Os pacientes serão selecionados no Setor de Hemodinâmica do Instituto Dante Pazzanase de Cardiologia entre os admitidos com sintomas ou sinais de isquemia do miocárdio, com lesões ateromatosas graves, com indicação de revascularização percutânea e implante de stent e que estejam sendo submetidos a tratamento prévio de dupla antiagregação com ácido acetilsalicílico e clopidogrel.

Amostras de sangue dos pacientes (31,5 mL no total) serão obtidas por punção da veia antecubital em uma coleta a ser realizada antes do procedimentos de revascularização percutânea.

As amostras serão colhidas no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia sob a supervisão do Dr. Marcelo F. Sampaio.

Serão realizadas as seguintes análises: determinação da função plaquetária, determinação da concentração plasmática dos antiagregantes, análise de expressão gênica diferencial por microarranjos e por PCR em tempo real, determinação de polimorfismos de um único nucleotídeo, determinações bioquímicas (glicose, colesterol total e frações, uréia, creatinina, ácido úrico, troponina, ALT, AST, PAI-1, fibrinogênio, produtos de degradação da fibrina, proteína C reativa, troponina, CK, CK-MB, VLDL e LDL) e leucograma.

Os pacientes serão submetidos a um questionário (Ficha para coleta de dados individuais) que inclui dados pessoais (Nome, data de preenchimento da ficha, data de nascimento) hábitos de vida e antecedentes (Hábito de fumar, Consumo de bebida alcoólica, profissão e exigência de exercício físico no trabalho, prática de exercício físico, peso, altura, doenças pré-existentes (diabetes, hipertensão, dislipidemia, insuficiência renal, história familiar) e uso de tratamento farmacológico anterior com os antiagregantes de interesse deste estudo (ácido acetilsalicílico e clopidogrel) incluindo dose, data de início do tratamento e data da última dosagem.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Presença de sintomas ou sinais de isquemia do miocárdio, com lesões ateromatosas graves, com indicação de revascularização percutânea e implante de stent e que estejam sendo submetidos a tratamento prévio de dupla antiagregação com ácido acetilsalicílico e clopidogrel.

Serão critérios de exclusão:

- contra-indicação para o uso de ácido acetilsalicílico ou bissulfato de clopidogrel
- insuficiência renal crônica
- insuficiência hepática
- insuficiência respiratória

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

- doenças hemorrágicas
- doenças endócrinas
- neoplasias
- hipercolesterolemia familiar conhecida ou presente em membros da família
- uso de anticoagulantes orais, antagonistas GPIIb/IIIa, uso de drogas ilícitas.

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 3 de agosto de 2009.

Atendendo a Resolução CNS 346/2005, este Comitê não enviará o presente protocolo à CONEP, uma vez que já foi enviado pelo Comitê de Ética do Instituto Dante Pazzanese. No entanto, o pesquisador responsável deverá aguardar a aprovação da CONEP para iniciar a pesquisa.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - a interrupção do projeto.
- Anexar a carta de aprovação da CONEP;
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 6 de junho de 2009.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora em exercício
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FCF/USP

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 757/2009

Registro CONEP: 15419 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE: 0020.0.131.018-09

Processo nº 25.000. 525587/2009-32

Projeto de Pesquisa: "Análise farmacogenômica pós-infarto agudo do miocárdio em pacientes com dupla antiagregação e indicação para implantação de stent".

Pesquisador Responsável: Dr. Mario Hiroyuki Hirata

Instituição: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) – SP (CENTRO ÚNICO)

CEP de origem: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) – SP

Área Temática Especial: Genética humana; Pesquisa com cooperação estrangeira

Patrocinador: Submissão à FAPESP/ Universidade de Santiago de Compostela (USC) - Espanha

Sumário geral do protocolo

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma afecção isquêmica que causa necrose tecidual decorrente da redução do fluxo sanguíneo coronário de um segmento do miocárdio. Inserida no contexto da síndrome coronariana aguda (SCA), este quadro pode envolver IAM com elevação do segmento ST (IAM-ST), IAM sem elevação do segmento ST (IAM sem ST) e angina instável. No Brasil, o Ministério da Saúde relatou que, em 2004, ocorreram 86.791 casos de óbitos por IAM, o que corresponde a aproximadamente 10% das internações do Sistema Único de Saúde (SUS). Estes dados demonstram a importante implicação do IAM na saúde pública e no que se refere aos gastos sanitários gerados para o seu diagnóstico e tratamento.

A conduta terapêutica para a resolução do IAM passou por profundas mudanças nos últimos anos. Em relação à restauração do fluxo sanguíneo, são consideradas basicamente duas estratégias: a primeira, denominada tratamento, tem como base a utilização de antiagregantes plaquetários, como aspirina (ácido acetilsalicílico, AAS) e tienopiridinas (ticlopidina e clopidogrel); inibidores dos receptores GPIIb/IIIa; heparina; anticoagulantes orais; nitratos; β -bloqueadores; magnésio; bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina e inibidores dos receptores de angiotensina. Mais recentemente, as vastatinas (sinvastatina e atorvastatina) também vêm sendo utilizadas por reduzirem a taxa de mortalidade por IAM. A segunda estratégia, denominada terapia de reperfusão intervencionista, consiste na angioplastia coronária transluminal percutânea (ACTP). A ACTP pode ser dividida em primária, de salvamento, eletiva e facilitada ou terapêutica, utilizando-se agentes fibrinolíticos como estreptoquinase, e fator ativador do plasminogênio tecidual (tPA). Ambas as estratégias vêm sendo avaliadas durante mais de vinte anos e apresentam uma boa associação à diminuição do grau de morbidade e mortalidade de pacientes pós-infarto.

A resistência à ação de antiagregantes plaquetários, com frequências que variam de 5 a 30%, como o bissulfato de clopidogrel e o AAS, contribui para uma evolução desfavorável do IAM em pacientes submetidos a angioplastia primária, pois o processo de agregação plaquetária participa intrinsecamente na sua patogênese. A resistência ao tratamento farmacológico, pode ser parcialmente explicada através da variabilidade inter-individual em cada paciente. Alguns fatores como sexo, idade, hábito de fumar, alimentação, interação com outros medicamentos e etnia podem alterar a biodisponibilidade do medicamento em relação à absorção, biotransformação e excreção (farmacocinética) ou ao seu modo de ação

(farmacodinâmica). Segundo alguns autores, a causa desta variabilidade poderia ser revelada através de estudos farmacogenômicos.

Neste contexto, o projeto em tela tem como objetivo realizar um estudo farmacogenômico de antiagregantes, logo após o IAM, em 82 pacientes com indicação de revascularização percutânea com angioplastia coronária e implante de *stent*. Os objetivos específicos propostos são: (a) avaliar a resposta ao tratamento com os antiagregantes bissulfato de clopidogrel e AAS através da medida qualitativa da disfunção plaquetária em pacientes pós-infarto agudo do miocárdio; (b) determinar as concentrações plasmáticas dos antiagregantes bissulfato de clopidogrel e AAS em pacientes sob tratamento com doses de 75 e 100mg, respectivamente, no momento da determinação da resposta ao tratamento; (c) avaliar o efeito dos antiagregantes no perfil de expressão gênica global, e suas variantes de *splicing*, dos leucócitos do sangue periférico; (d) estudar a relação existente entre os perfis de expressão gênica e polimorfismos presentes em genes envolvidos na biotransformação do bissulfato de clopidogrel e do AAS; e (e) avaliar as correlações entre expressão gênica, presença de SNPs, inibição da agregação plaquetária e concentrações dos antiagregantes.

Os pacientes estarão com tratamento prévio, com os antiagregantes AAS (100mg/24h) e bissulfato de clopidogrel (75mg/24h) por um período mínimo de 5 dias antes da ACTP. Os pacientes com resposta considerada indesejada (<30% inibição de PRU (PY12R2 reaction unit) para clopidogrel e >550 ARU (aspirin reaction unit)) serão considerados não respondedores. As concentrações plasmáticas de antiagregantes serão determinadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). A taxa de agregação será medida utilizando-se o sistema *Verify Now* (Accumetrix). A expressão gênica global dos leucócitos do sangue periférico será avaliada por tecnologia de microarranjos utilizando o sistema *Exon Array ST 1.0* (Affymetrix). As características genotípicas dos pacientes serão avaliadas pelo sistema SNPplex (Applied Biosystems).

Segundo os autores, o estudo contribuirá para o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta de leucócitos periféricos ao tratamento com antiagregantes e sua relação com o perfil farmacogenético dos pacientes. Também contribuirá para a transferência de tecnologia ainda não disponível no Brasil e viabilizará a formação de recursos humanos especializados em pesquisas aplicadas à análise genômica no contexto da resposta ao tratamento.

Os critérios de inclusão incluem: indivíduos do sexo masculino com idade entre 30 e 80 anos, admitidos com sintomas ou sinais de isquemia do miocárdio, com lesões ateromatosas graves (>75% por estimativa visual ou >50% por estimativa angiográfica automática quantitativa), com indicação de revascularização percutânea e implante de *stent* e que estejam submetidos a um tratamento prévio de dupla antiagregação de AAS e clopidogrel na dosagem de 100 mg e 75mg respectivamente, por via oral e em dose única por dia, para pacientes com menos que 75 kg de peso ou 150 mg de AAS para pacientes com mais que 75 kg de peso, por no mínimo 5 dias. Por outro lado, os critérios de exclusão são os seguintes: contra-indicação para o uso de AAS ou bissulfato de clopidogrel, insuficiência renal crônica, insuficiência hepática, insuficiência respiratória, doenças hemorrágicas, doenças endócrinas, neoplasias, hipercolesterolemia familiar conhecida ou presente em membros da família, uso de anticoagulantes orais, antagonistas GPIIb/IIIa e uso de drogas ilícitas.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional, que será realizado somente no centro em tela e contará com participação estrangeira.

Os sujeitos da pesquisa serão selecionados exclusivamente no Brasil, dentre os pacientes do Setor de Hemodinâmica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), em São Paulo SP.

Algumas análises serão realizadas no Brasil (a saber, determinação da disfunção plaquetária e determinações laboratoriais no IDPC e extração do DNA/RNA total no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da Universidade de São Paulo/ LABMAD-FCF/USP) e outras no exterior, sendo realizada a determinação das concentrações plasmáticas dos antiagregantes no Departamento de Toxicologia da Universidade de Santiago de Compostela, e a determinação da expressão gênica diferencial por microarranjos e dos SNPs por SNPlex no Centro Nacional de Genotipado (CeGen), ambos na Espanha. A análise dos resultados da expressão gênica por PCR em tempo real contará com a assessoria científica da professora associada Sonia Q. Dóí, pesquisadora da *Uniformed Services of Health Sciences*, dos Estados Unidos da América (EUA).

Apresentação do protocolo

Os currículos dos pesquisadores brasileiros, disponíveis na Plataforma Lattes/CNPq, foram indicados, observando-se adequação à proposta. Constatam declarações individuais de todos os integrantes da equipe, certificando sua participação na pesquisa. Da mesma forma, os colaboradores espanhóis confirmaram o suporte científico e técnico à pesquisa através da apresentação de declarações individuais.

A definição da casuística e o cálculo do tamanho amostral foram apresentados. A forma de recrutamento e os critérios de inclusão e exclusão estão adequados à proposta. Os procedimentos analíticos foram apresentados em detalhes. O sangue total será utilizado completamente para a extração de DNA, RNA e produção de cDNA a ser empregado nas etapas de genotipagem e transcriptoma. Os cDNAs serão enviados ao exterior em volumes exatos para a realização de uma análise por paciente, não havendo sobra do material enviado. Ou seja, não se verifica a intenção de constituição de banco de amostras biológicas no exterior. Segundo o cronograma apresentado à página 44 (numeração do CEP), a pesquisa terá duração de quatro anos, com início previsto no primeiro semestre de 2009.

O orçamento financeiro foi apresentado de forma detalhada (páginas 47 e 48, numeração do CEP), alternando valores em reais, dólares e euros. Na página 51 (numeração do CEP) consta que o recurso financeiro necessário para o custeio do projeto será solicitado à FAPESP. Caso não haja a aprovação deste órgão, os pesquisadores recorrerão ao CNPq. Os materiais e reagentes para as determinações dos genótipos serão fornecidos pelo colaborador estrangeiro, Prof. Angel Carracedo (USC, Espanha).

Há garantias explícitas quanto à manutenção do anonimato e do caráter confidencial e sigiloso das informações (Resolução CNS 340/2004, item V.1."b" e Resolução CNS 196/96; item IV.1."g"). Oferece possibilidade de contato com a equipe responsável e com CEP local (Resolução CNS 196/96; item IV.1."e") e de acesso aos resultados dos testes genéticos ao término da pesquisa (Resolução CNS 340/2004, item V.1."d"). Consta pedido de autorização para armazenamento do DNA para pesquisas futuras, com compromisso de consulta ao sujeito sobre o novo projeto (Resolução CNS 340/2004, item V.1."e" e Resolução CNS 347/2005, item 1.2). Finalmente, informa que não haverá prejuízo ou perda de benefício ao tratamento médico em caso de recusa ou retirada do consentimento (desistência) a qualquer momento (Resolução CNS 196/96; item IV.1."f").

Em anexo, constam declarações assinadas pelo pesquisador responsável em que este (a) compromete-se com a publicação dos resultados, sendo estes favoráveis ou não; (b) justifica a dispensa de submissão do protocolo à avaliação ética na Universidade de Compostela; e (c) declara que material coletado será unicamente utilizado na execução das genotipagens previstas.

Em declaração à página 71 (numeração do CEP) de 18/03/2009, a Profa. Ana Campa, declara ciência e atesta as condições para a realização da pesquisa nas dependências do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP. Adicionalmente, consta Declaração de Infra-Estrutura do IDPC (página 78, numeração do CEP), de 22/04/2009, assinada pela Dra. Amanda Guerra M. R. de Souza, Diretora Técnica do Departamento de Saúde desta Instituição.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (páginas 45-46, numeração do CEP) tem redação sucinta e foi redigido sob forma de convite. Contém as informações essenciais para o entendimento da natureza do estudo. Os objetivos e procedimentos

relativos à participação encontram-se suficientemente descritos (Resolução CNS 196/96, item IV.1."a"). Os responsáveis pela pesquisa e pelo acompanhamento foram indicados (Resolução CNS 196/96, item IV.1."d").

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP nº 449/2009, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. A respeito da Folha de Rosto (FR) da pesquisa cabem as seguintes considerações:

- a. Solicita-se informar a intenção de constituição de banco de materiais biológicos com as amostras que serão coletadas no estudo em análise, uma vez que na versão apresentada consta "NÃO" no campo de preenchimento respectivo. Solicita-se adequação.

Resposta: O pesquisador responsável afirma que a constituição de banco de material biológico foi retirada do estudo sendo, então, justificada a manutenção do referido "NÃO" na FR.

Análise: Pendência **atendida**.

- b. O Dr. Dikran Armaganijan, Diretor de Divisão Clínica do IDPC, assina o Termo de Compromisso na FR como responsável pela Instituição. No entanto, o Dr. Armaganijan integra a equipe de pesquisadores, conforme declarações nas páginas 68 e 73 (numeração do CEP), o que pode ser caracterizado como a ocorrência de um potencial conflito de interesses. Portanto, solicita-se a substituição da anuência (assinatura) do Dr. Armaganijan pela de outro profissional que possa responder como responsável institucional, não pertencente à equipe de pesquisadores do estudo em tela. Solicita-se adequação.

Resposta: Em atendimento, a FR foi reapresentada com a assinatura do Dr. Fausto, Diretor do Serviço de Cardiologia Invasiva do IDPC, indicado como responsável institucional.

Análise: Pendência **atendida**.

- c. Foi informado, na página 54 (numeração do CEP) que este projeto se trata do projeto de Doutorado direto do aluno André Ducati Luchessi, sob orientação do Dr. Mario Hirata, no entanto, quem assina como pesquisador responsável pelo estudo é o Dr. Mario Hirata. Solicita-se esclarecer se a Dra. Maria Fátima Glaner é de fato a pesquisadora responsável, pois é informado que se trata de um projeto de doutorado do aluno André Ducati Luchessi, sob orientação do Dr. Mario Hirata. Solicita-se esclarecimento e adequação das informações.

Resposta: O Dr. Mario Hirata reafirma sua condição de responsável pelo estudo e como orientador do doutoramento direto do aluno André D. Luchessi na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Adicionalmente, informa que a Dra. Maria F. Glaner não pertence à equipe de pesquisadores, o que posteriormente verificou-se tratar de um equívoco da Secretaria Executiva da CONEP quando da finalização do Parecer 449/2009.

Análise: Pendência **atendida**.

2. No item 5.2 "Local de Armazenamento de Amostras" (página 35, numeração do CEP) é informado que "As amostras biológicas (sangue total e plasma) serão armazenadas única e exclusivamente no LABMAD-FCF/USP. Não haverá armazenamento das mesmas no IDPC-SP ou Universidade de Santiago de Compostela (Espanha)". No mesmo item, mais à frente, e também no TCLE, é mencionada a possibilidade de "contato com os doadores para fornecimento de informações de nosso interesse ou para a obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa, após aprovação do projeto pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP". Portanto, solicita-se que o protocolo seja adequado às diretrizes da Resolução CNS 347/05, que regulamenta o armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa. Em particular, o protocolo deverá apresentar os requisitos dispostos nos itens 1.1 ("Justificativa quanto a necessidade e oportunidade

Cont. Parecer CONEP nº 757/09

mínimo e haverá apenas a coleta de aproximadamente 30mL de sangue periférico (sangue circulante nas suas veias), com o possível efeito indesejado (hematoma, pequenas manchas escuras, que podem ser castanhas, encarnadas ou azul-negro, localizada sob a pele)".

Análise: As adequações e esclarecimentos apresentados relativamente às considerações "6b-d" são suficientes. Porém, apesar de a possibilidade de ocorrência de hematomas ter sido acrescida ao TCLE, outros desconfortos e riscos associados à punção venosa (desmaio, dor no local da picada, infecção) foram ignorados. Solicita-se adequação.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões 6 acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 20 de outubro de 2009.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO 4. LISTA DE GENES E SNPs SELECIONADOS

Genes	Código	Cromossomo	Posição	Alelo
<i>ABCB1</i>	rs10260862	7	87201482	G/C
	rs10264990	7	87202615	C/T
	rs10274587	7	87164483	G/A
	rs1045642	7	87138645	A/G
	rs1128503	7	87179601	A/G
	rs1202175	7	87209150	G/A
	rs1202184	7	87213901	C/T
	rs12704364	7	87181175	C/T
	rs13229143	7	87219481	G/C
	rs13233308	7	87244960	C/T
	rs17327442	7	87212990	T/A
	rs17327624	7	87216817	G/T
	rs1922240	7	87183354	T/C
	rs2032582	7	87160618	A/T/C
	rs2214102	7	87229501	T/C
	rs998671	7	87123275	C/T
<i>CES1</i>	rs3859101	16	55867581	G/A
	rs6499788	16	55871837	T/A
<i>COMT</i>	rs11705619	22	19924579	T/C
	rs165774	22	19952561	G/A
	rs165849	22	19958669	G/A
	rs174674	22	19934025	A/G
	rs174696	22	19953176	C/T
	rs4633	22	19950235	C/T
	rs4646312	22	19948337	T/C
	rs4646316	22	19952132	C/T
	rs4680	22	19951271	G/A
	rs4818	22	19951207	C/T/G
	rs5746846	22	19920646	C/G
	rs5746847	22	19921003	T/C
	rs740603	22	19945177	A/G
	rs887199	22	19961955	A/G
	rs9332377	22	19955692	C/T
	rs9605030	22	19921137	C/T
<i>CYP1A2</i>	rs11854147	15	75052771	T/C
	rs2470890	15	75047426	C/T
<i>CYP2B6</i>	rs11666982	19	41531368	T/G
	rs1552222	19	41525904	T/A
	rs2054675	19	41495755	T/C

	rs2099361	19	41498348	C/A
	rs3745277	19	41531915	G/A
	rs434606	19	41532005	G/A
	rs7250873	19	41503622	A/G
	rs7255146	19	41532126	C/A
	rs8109525	19	41491918	A/G
	rs8192719	19	41518773	C/T
<i>CYP2C19</i>	rs10786172	10	96581094	A/G
	rs11597626	10	96604273	C/G
	rs1555474	10	96605327	G/C
	rs3758580	10	96602622	C/T
	rs3758581	10	96602623	G/A
	rs4244285	10	96541616	G/A/C
<i>CYP2C9</i>	rs10509679	10	96708226	G/A
	rs1057911	10	96748737	A/T
	rs1200313	10	96722059	C/A
	rs1934963	10	96734676	T/C
	rs1934967	10	96741426	C/T
	rs2153629	10	96741795	A/G
	rs2475376	10	96712400	A/G
	rs4918766	10	96711884	G/A
<i>CYP3A4</i>	rs12333983	7	99354114	T/A
	rs2246709	7	99365719	A/G
	rs4646437	7	99365083	G/A
<i>CYP3A5</i>	rs4646450	7	99266318	G/A
<i>CYP5A1</i>	rs1044718	7	139723596	G/A
	rs10487667	7	139684043	T/G
	rs11761051	7	139704563	A/C
	rs11772680	7	139676574	G/C
	rs11973494	7	139607500	C/A
	rs12532529	7	139553090	C/T
	rs12532701	7	139521534	A/G
	rs12540398	7	139547370	G/A
	rs12667080	7	139525212	G/A
	rs13239058	7	139643118	C/T
	rs1557968	7	139650762	A/G
	rs17161326	7	139693170	T/A
	rs1978180	7	139609317	C/T
	rs2214757	7	139550679	A/G
	rs2267679	7	139539218	C/T
	rs2267681	7	139540935	C/G
	rs2267691	7	139596859	C/T

	rs2267701	7	139672739	G/C
	rs2284205	7	139620388	G/A
	rs2284207	7	139640362	C/T
	rs2284211	7	139676790	A/G
	rs2284212	7	139695316	G/A
	rs2299890	7	139584505	G/A
	rs3779130	7	139705843	C/T
	rs3801148	7	139694500	C/T
	rs3801150	7	139685695	C/T
	rs3823717	7	139657221	T/C
	rs41715	7	139674671	T/C
	rs41717	7	139670417	T/C
	rs41718	7	139668438	G/A
	rs4726457	7	139623170	G/A
	rs4726499	7	139688004	G/A
	rs6464431	7	139590668	T/A
	rs6953224	7	139521716	C/G
	rs6962291	7	139671117	T/A
	rs757760	7	139644600	T/C
	rs7806848	7	139689024	G/C
	rs7810415	7	139544674	C/T
	rs7810727	7	139591860	C/T
	rs8192805	7	139542202	C/T
	rs8192810	7	139564806	T/C
	rs8192835	7	139656609	C/T
	rs8192859	7	139694661	C/T
<i>GPIa</i>	rs1062535	5	52351413	G/A
	rs1126643	5	52347369	C/T
	rs11741738	5	52320029	A/G
	rs11955860	5	52329341	A/G
	rs12523395	5	52334774	A/G
	rs1421931	5	52349088	G/C
	rs1445941	5	52374227	A/C
	rs152088	5	52309015	C/T
	rs153141	5	52304996	A/G
	rs16880636	5	52301091	C/T
	rs246406	5	52319076	C/T
	rs26682	5	52289766	T/G
	rs27618	5	52320893	T/C
	rs27915	5	52287624	A/G
	rs3212433	5	52337144	C/T
	rs3212446	5	52339114	T/C

	rs3212523	5	52351876	A/G
	rs3212574	5	52366779	G/A
	rs3212576	5	52366905	A/G
	rs3212603	5	52373810	C/T
	rs3212684	5	52355516	G/A
	rs33443	5	52279233	T/A
	rs33446	5	52282031	C/G
	rs4865756	5	52313564	G/A
	rs6859355	5	52301716	C/T
	rs7705328	5	52323568	A/G
	rs7735277	5	52318916	C/T
<i>ITGA2B</i>	rs5910	17	42449789	G/A
	rs850737	17	42443784	T/C
	rs936019	17	42475983	G/C
<i>ITGB3</i>	rs11657517	17	45343713	C/T
	rs11868894	17	45353189	T/C
	rs12600865	17	45393984	T/C
	rs12603582	17	45377577	G/T
	rs15908	17	45368337	A/C
	rs2056131	17	45333743	A/G
	rs2317385	17	45329682	G/A
	rs3809863	17	45385012	C/T
	rs3851806	17	45350919	G/C
	rs4525555	17	45337949	C/T
	rs4642	17	45369777	A/G
	rs5918	17	45360730	T/C
	rs7212751	17	45355499	A/G
	rs8066295	17	45348203	G/A
<i>NR1I2</i>	rs1054190	3	119536718	C/T
	rs10934498	3	119504381	G/A
	rs11926554	3	119495556	T/C
	rs2037547	3	119544615	T/C
	rs2056530	3	119506462	T/C
	rs2461825	3	119529605	A/G
	rs2472677	3	119518417	C/T
	rs3732360	3	119536581	C/T
	rs3732361	3	119542297	A/G
	rs6438549	3	119523746	A/G
	rs6772976	3	119519464	G/A
	rs7643645	3	119525497	A/G
<i>P2RY1</i>	rs12497578	3	152556473	C/G
	rs17451266	3	152550494	G/T

	rs701265	3	152554357	A/G
<i>P2RY12</i>	rs12497089	3	151096164	T/A
	rs1565574	3	151067730	C/T
	rs3971192	3	151047828	A/G
	rs4603933	3	151103070	T/G
	rs6785930	3	151056616	G/A
	rs6787801	3	151099741	A/G
	rs6798347	3	151106158	G/A
	rs6809699	3	151056598	A/C
	rs9856118	3	151078216	A/G
	rs9859538	3	151090963	G/A
	rs9868730	3	151098259	C/T
	rs10306135	9	125137695	A/T
	rs10513402	9	125164936	T/C
	rs1236913	9	125133479	T/C
<i>PTGS1</i>	rs3842787	9	125133507	C/T
	rs4837960	9	125123971	G/T
	rs5788	9	125143792	C/A
	rs5789	9	125143973	C/A
	rs6478565	9	125148632	A/G
	rs950104	9	125165225	A/G
<i>PTGS2</i>	rs10911902	1	186632317	C/T
	rs12042763	1	186651876	G/T
	rs2143417	1	186653787	G/T
	rs5275	1	186643058	A/G
	rs5277	1	186648197	C/G
	rs689466	1	186650751	T/C
<i>UGT1A6</i>	rs1042640	2	234681544	G/C
	rs1105879	2	234602202	A/C
	rs11888492	2	234679974	C/G
	rs12474980	2	234600116	G/A
	rs17863787	2	234611094	T/G
	rs2302538	2	234676413	T/C
	rs3755319	2	234667582	A/C
	rs3771342	2	234672663	G/T
	rs4148328	2	234677659	C/T
	rs4233633	2	234619937	G/C
	rs4663335	2	234689090	G/A
	rs6431633	2	234690791	A/G
	rs6717546	2	234682119	A/G
	rs6746002	2	234689421	A/G
	rs929596	2	234674476	A/G

ANEXO 5. Lista dos genes identificados como diferentemente expressos nos testes entre Q1 e Q4 em relação a resposta ao AAS.

Gene	SeqRef	<i>p</i>	Varição (Q1 xQ4)
<i>KCTD21</i>	NM_001029859	0,00002988	1,5143
<i>SEMA3D</i>	NM_152754	0,00006358	1,22901
<i>ATP6V1G3</i>	NM_133326	0,00082312	1,24561
<i>PSG9</i>	NM_002784	0,00095200	1,2638
<i>STOX1</i>	NM_152709	0,00120657	1,26281
<i>COX7A2</i>	NM_001865	0,00126073	1,37049
<i>ENG</i>	NM_000118	0,00137569	1,21959
<i>SNAP23</i>	NM_003825	0,00158758	-1,44654
<i>C4orf31</i>	NM_024574	0,00165333	1,22327
<i>ARHGEF5L</i>	NM_001003702	0,00184396	1,43683
<i>IK</i>	NM_006083	0,00192327	-3,15348
<i>C6orf146</i>	BC039349	0,00214333	1,23102
<i>RSF1</i>	NM_016578	0,00214899	-1,28953
<i>LRRC67</i>	NM_001013626	0,00214960	1,25135
<i>FSD1L</i>	NM_031919	0,00219860	1,30684
<i>ZNF211</i>	NM_006385	0,00253727	-1,43726
<i>PQLC2</i>	NM_001040125	0,00254347	1,24127
<i>ANP32D</i>	NM_012404	0,00255285	1,56716
<i>C4orf21</i>	NM_001099776	0,00266440	1,24278
<i>PRDM9</i>	NM_020227	0,00271172	1,31456
<i>GGH</i>	NM_003878	0,00275410	1,25442
<i>HEATR5A</i>	NM_015473	0,00278813	-1,48617
<i>YWHAH</i>	NM_003405	0,00281954	-1,59518
<i>NTNG1</i>	NM_001113226	0,00291745	1,20956
<i>PLIN5</i>	NM_001013706	0,00335708	-1,62946
<i>ANAPC4</i>	NM_013367	0,00336435	1,62386
<i>TDGF1</i>	NM_003212	0,00358751	1,49898
<i>MSTO1</i>	NM_018116	0,00368657	1,33383
<i>EPGN</i>	NM_001013442	0,00382952	1,20981
<i>OR5M8</i>	NM_001005282	0,00385987	1,32054
<i>LOC554203</i>	NR_024582	0,00388215	1,31648
<i>NEUROD6</i>	NM_022728	0,00398597	1,26538
<i>ZNF770</i>	NM_014106	0,00402564	1,24082
<i>FBLN2</i>	NM_001004019	0,00411428	-1,44801
<i>PSG1</i>	NM_006905	0,00416085	1,30342
<i>PDC</i>	NM_002597	0,00422332	1,31255
<i>OR2B2</i>	NM_033057	0,00431390	1,30653
<i>HSPA1A</i>	NM_005345	0,00445131	-2,05673
<i>RNF212</i>	NM_001131034	0,00460998	1,20705
<i>DEPDC1</i>	NM_001114120	0,00466093	1,32625
<i>NKAIN3</i>	NM_173688	0,00474477	1,25656

<i>KCNMB1</i>	NM_004137	0,00497043	1,35199
<i>PAM</i>	NM_000919	0,00505383	-1,70834
<i>CWH43</i>	NM_025087	0,00518588	1,28434
<i>ASPM</i>	NM_018136	0,00533141	1,21152
<i>TECRL</i>	NM_001010874	0,00534041	1,22442
<i>ZNF789</i>	NM_213603	0,00534288	1,26886
<i>APH1B</i>	NM_031301	0,00537866	-1,42597
<i>RFPL1</i>	NM_021026	0,00541968	1,30382
<i>C1QTNF2</i>	NM_031908	0,00552222	1,23653
<i>DIAPH3</i>	NM_001042517	0,00554309	1,20472
<i>ECT2</i>	NM_018098	0,00563176	1,23292
<i>GUCA1C</i>	NM_005459	0,00568026	1,32598
<i>THEM5</i>	NM_182578	0,00569716	1,26697
<i>GPR177</i>	NM_024911	0,00574411	-2,09465
<i>PAFAH1B2</i>	NM_002572	0,00574690	-1,22676
<i>ADH1B</i>	NM_000668	0,00589059	1,2207
<i>HS3ST3B1</i>	NM_006041	0,00603378	-1,55128
<i>NFIA</i>	NM_001134673	0,00603941	1,28335
<i>DDX43</i>	NM_018665	0,00605905	1,25341
<i>DPP10</i>	NM_020868	0,00612861	1,22736
<i>VANGL1</i>	NM_138959	0,00626766	1,26724
<i>FDPS</i>	NM_001135821	0,00628832	1,21718
<i>OR6K3</i>	NM_001005327	0,00633987	1,25973
<i>CRYGC</i>	NM_020989	0,00634639	1,26198
<i>FAM84A</i>	NM_145175	0,00641913	1,21
<i>A2ML1</i>	NM_144670	0,00647838	1,20188
<i>SNX17</i>	NM_014748	0,00650773	1,24052
<i>REM2</i>	NM_173527	0,00651549	-1,32903
<i>TNFAIP8L3</i>	NM_207381	0,00651670	1,20388
<i>FAM13A</i>	NM_014883	0,00654415	1,2412
<i>TRAIP</i>	NM_005879	0,00662957	1,28581
<i>SPC25</i>	NM_020675	0,00670040	1,25323
<i>FLJ42875</i>	NR_015440	0,00672154	1,21426
<i>DDAH1</i>	NM_012137	0,00677129	1,23999
<i>MSH4</i>	NM_002440	0,00682049	1,2513
<i>PMCHL2</i>	NR_003922	0,00686487	1,33492
<i>IL2RA</i>	NM_000417	0,00697574	-1,70239
<i>GAFA3</i>	AF220235	0,00704847	1,29724
<i>WNT9A</i>	NM_003395	0,00708555	1,24065
<i>ARPM1</i>	NM_032487	0,00719699	1,31287
<i>FAM47E</i>	NM_001136570	0,00721870	1,2085
<i>C14orf101</i>	NM_017799	0,00745450	-1,3805
<i>C4B</i>	NM_001002029	0,00750282	1,26511
<i>ANKRD7</i>	NM_019644	0,00751449	1,24719
<i>DPY19L3</i>	NM_207325	0,00756198	-1,35403
<i>IL1A</i>	NM_000575	0,00757115	1,48137

<i>RARRES1</i>	NM_206963	0,00776131	1,23856
<i>ZC3HAV1L</i>	BC020784	0,00776440	1,35187
<i>NCRNA00116</i>	BC064430	0,00782590	1,24111
<i>AGBL3</i>	NM_178563	0,00782984	1,37924
<i>ST20</i>	NM_001100879	0,00787827	-2,04447
<i>CENPE</i>	NM_001813	0,00795380	1,20481
<i>FGG</i>	NM_021870	0,00797902	1,3068
<i>USP6NL</i>	NM_014688	0,00831755	-1,43049
<i>ADD3</i>	NM_016824	0,00837718	-1,45249
<i>TPD52L2</i>	NM_199360	0,00837818	-1,3688
<i>IGF1R</i>	NM_000875	0,00851417	-1,85188
<i>CCL26</i>	NM_006072	0,00868155	1,3205
<i>AKTIP</i>	NM_001012398	0,00868185	-1,56268
<i>SSU72</i>	NM_014188	0,00881506	-1,46923
<i>CXCR7</i>	NM_020311	0,00883611	1,29479
<i>ST3GAL4</i>	NM_006278	0,00894419	-1,29117
<i>UGT2B10</i>	NM_001075	0,00898945	1,39402
<i>DNAH6</i>	NM_001370	0,00899801	1,24399
<i>UNQ3104</i>	AY358109	0,00902419	-1,49581
<i>SLCO6A1</i>	NM_173488	0,00905758	1,27926
<i>CCL8</i>	NM_005623	0,00909551	1,29783
<i>CTD-2090I13.4</i>	BC062736	0,00960420	1,26541
<i>OR13C2</i>	NM_001004481	0,00966809	1,59276
<i>UGT2B7</i>	NM_001074	0,00968471	1,55453
<i>PRDX3</i>	NM_006793	0,00969143	-1,29347
<i>FLJ32955</i>	AK057517	0,00972576	1,24873
<i>PSIP1</i>	NM_033222	0,00977382	-1,40486
<i>GPR111</i>	NM_153839	0,00984050	1,30349
<i>C21orf74</i>	AY077696	0,00984922	1,23823
<i>RPI</i>	NM_006269	0,00989461	1,20504

ANEXO 6. Lista dos genes identificados como diferentemente expressos nos testes entre Q1 e Q4 em relação a resposta ao clopidogrel.

Gene	SeqRef	<i>p</i>	Variação (Q1 x Q4)
<i>ABO</i>	NM_020469	0,00018047	1,21216
<i>CYS1</i>	NM_001037160	0,00025958	-1,35786
<i>SULT1A1</i>	NM_177536	0,00087177	1,24651
<i>INSL3</i>	NM_005543	0,00190497	1,34317
<i>ST13</i>	NM_003932	0,00214096	-1,41369
<i>C19orf55</i>	BC110893	0,00240172	1,20119
<i>C1orf85</i>	NM_144580	0,00250510	-1,6559
<i>FAM20B</i>	NM_014864	0,00277479	-1,28094
<i>NFXL1</i>	NM_152995	0,00413188	-2,2031
<i>HIST1H2BJ</i>	NM_021058	0,00472039	-1,29864
<i>MRPS33</i>	NM_016071	0,00522778	-1,27487
<i>CA2</i>	NM_000067	0,00556795	-1,77576
<i>TFDP2</i>	NM_006286	0,00562650	-1,5927
<i>UBE2F</i>	NM_080678	0,00570120	-2,10766
<i>TRY6</i>	NR_001296	0,00592480	1,3213
<i>NOP56</i>	NR_027700	0,00633403	-1,44261
<i>MBP</i>	NM_001025081	0,00661063	1,34221
<i>GUCA2B</i>	NM_007102	0,00722702	1,20211
<i>MKRNI</i>	NM_013446	0,00725619	-1,59038
<i>UBTD1</i>	NM_024954	0,00755720	1,20584
<i>ELK4</i>	NM_001973	0,00758065	-1,26606
<i>IGHMBP2</i>	NM_002180	0,00761335	-1,73077
<i>ENDOD1</i>	NM_015036	0,00766907	-1,34171
<i>ABCC3</i>	NM_003786	0,00819440	-1,22942
<i>SPRR1A</i>	NM_005987	0,00846921	1,41247
<i>USP45</i>	NM_001080481	0,00847200	-1,21259
<i>LY6H</i>	NM_001135655	0,00853194	1,22083
<i>ORAI3</i>	NM_152288	0,00930185	1,24424
<i>HECTD3</i>	NM_024602	0,00954037	-1,34018

Blood transcriptome profile and antiplatelet drug resPONse studies in patients with acute myocardial infarction

Author Block: *A. D. Luchessi¹, V. N. Silbiger¹, R. D. C. Hirata¹, A. Carracedo², M. Brión^{2,3}, A. Iñiguez⁵, M. S. Bravo⁵, G. Bastos⁵, L. G. Lima:Neto¹, A.G.M.R. Souza⁴, M. H. Hirata¹. ¹Faculdade de Ciências Farmacêutica : Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Grupo de Medicina Xenómica, Universidad de Santiago de Compostela, CIBERER, Spain, ³Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Spain, ⁴Instituto Dante Pazzanese do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁵Hospital Meixoeiro, Vigo, Spain.*

Background: Some patients with acute myocardial infarction (AMI) who undergo coronary angioplasty have low resPONse to antiplatelet drugs such as acetylsalicylic acid (AAS) and clopidogrel. This condition maybe partially explained by differences in drug pharmacokinetics and pharmacodynamics, including the pharmacogenetic profile.

Objetctives: To investigate the relationship between resPONse to antiplatelet drugs and global RNAm gene expression in peripheral blood cells (PBC) in patients with AMI.

Methods: Twenty:six AMI patents who undergo percutaneous coronary intervention (PCI) were recruited from Hospital doMeixoeiro, Vigo, Spain. Patients were treated crhonicly with AAS (100 mg/day) and clopidogrel (75 mg/day). Blood samples were drown before PCI to evaluate platelet reactivity and RNA extraction. Platelet reactivity was measured using VerifyNow AAS for AAS and P2Y12 for clopidogrel assays (Accumetrics, USA) kits. RNA was extracted from PBC using PAXgene Blood RNA kit (Qiagen, USA) and the automated Qiacube system (Qiagen, USA). Transcriptome analysis was carried out using the Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST array (Affymetrix, USA). Signals were quartile:normalized by the Partek genomic suit software (Partek incorporated, USA). Functional interpretation in terms of biological process, molecular interaction and disease processes were performed by the Ingenuity Systems software v. 8.4 (Ingenuity, USA).

Results: Platelet resPONse to clopidogrel (PRU) and to AAS (ARU) values were categorized in quartiles. For clopidogrel, PRU quartile 1 (Q1) and 4 (Q4) were 121±42 and 301±46, respectively. For AAS, ARU values were 384±6 and 504±34, in the Q1 and Q4, respectively. After normalization, filtering and statistics analysis of transcriptomic data, 29 genes were differentially expressed, with 1.2 fold change, between Q1 and Q4 (p<0.01) PRU values. For ARU data, 117 genes were differentially expressed between (Q1 vs Q4 (p<0.01). Functional analysis showed that 17 genes were differently expressed (11 upregulated and 6 downregulated) when ARU Q1 and Q4 quartiles values were compared (p<0.01). Two genes were upregulated and 7 were downregulated by functional analysis after comparison of the PRU Q1 and Q4 quartile data.

Conclusion: These results suggest that differences in platelet resPONses to AAS and clopidogrel influence gene expression in PBC, and transcriptome analysis of antiplatelet drugs may provide evidences for new markers useful for monitoring antiplatelet therapy in AMI individuals undergo angioplasty.

Clopidogrel resPOnse is affected by ABCC3 expression but not ABCB1 in CAD patients

AD Luchessi¹, VN Silbiger¹, RDC. Hirata¹, A Carracedo², M Brión^{2,3}, A Iñiguez⁵, MS Bravo⁵, G Bastos⁵, AGMR Sousa⁴, MH Hirata¹. ¹School of Pharmaceutical Sciences – University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, ²Grupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, CIBERER, Spain, ³Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Spain, ⁴Instituto Dante Pazzanese do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁵Hospital Meixoeiro, Vigo, Spain.

Introduction: ABCB1 and ABCC3 genes are members of ATP-binding cassette (ABC) family that might be associated with inadequate generation of active metabolites, therefore limiting intestinal absorption and resulting in failure in antiplatelet resPOnse with clopidogrel treatment.

Objective: Investigate the influence of the clopidogrel therapy in the ABCB1 and ABCC3 gene expression in patients with coronary arterial disease (CAD), using peripheral blood cells (PBC) as a model.

Methods: Twenty-six CAD patients who undergo percutaneous coronary intervention (PCI) were selected at Hospital do Meixoeiro, Vigo, Spain. Patients were treated chronically with clopidogrel (75 mg/day). Peripheral blood samples were drawn before PCI to evaluate platelet reactivity and RNA extraction. Platelet reactivity was measured in PRU with VerifyNow P2Y12 for clopidogrel assays (Accumetrics, USA). PBC total RNA was extracted with PAXgene Blood RNA kit (Qiagen, USA) in the automated Qiacube system (Qiagen, USA). ABCC3 and ABCB1 RNA expression were measured by Taqman Real time PCR (Applied Biosystems, USA), using GAPD as endogenous reference.

Results: Platelet aggregation resPOnse to clopidogrel was categorized in quartiles. FIRST quartile (Q1) patients with 121±42 PRU were classified as good resPOnsers, and fourth quartile (Q4), were considered nonresPOnsers, with values of 301±46 PRU. No change was observed in the ABCB1 expression comparing Q1 and Q4 ($p>0.05$). However, ABCC3 was 1.7 times more expressed in the Q1 than Q4 ($p<0.05$). Linear regression analysis demonstrated that patients with low ABCC3 RNA expression ($2^{-\Delta Ct} < 0.0025$) have an average decrease of 73 PRU ($p<0.05$) and logistic regression showed that these individuals have reduced risk for poor resPOnse to clopidogrel (OR: 0.06, 95% CI: 0.006:0.522).

Conclusion: ABCC3 RNA was significantly more expressed in patients with poor clopidogrel resPOnse. This study suggests that ABCC3 is involved in clopidogrel efflux, possibly associated with a lower bioavailability to hepatic formation of active metabolites.

ANEXO 9. Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 3533657/1 - André Ducati Luchessi

Email:	adluchessi@usp.br
Data de Nascimento:	05/04/1982
Cédula de Identidade:	RG - 33.552.093-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008

Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	11/02/2008
Início da Contagem de Prazo:	11/02/2008
Data Limite:	11/02/2012
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 11/02/2008 até o presente. E.Mail: mhirata@usp.br
Coorientador:	Prof(a). Dr(a). Angel Carracedo Alvarez - 19/05/2010 até o presente. E.Mail: ANGEL.CARRACEDO@USC.ES
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 15/10/2009
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 04/02/2011
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado Direto em 11/02/2008 Matrícula de Acompanhamento em 26/01/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 26/01/2011

Impresso em: 11/07/11 09:38:23

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 3533657/1 - André Ducati Luchessi

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5761-5/2	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	03/03/2008	30/03/2008	60	4	80	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0417 Fisiopatologia III, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2009	30/11/2009	-	3	0	-	-	-
FBC5757-2/1	Tópicos em Análises Clínicas II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	80	A	N	Concluída
FBC5756-1/3	Alterações Moleculares na Doença Renal Crônica	31/08/2009	20/09/2009	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5728-2/10	Aprimoramento Didático	21/09/2009	18/10/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5793-9/2	Tópicos em Análises Clínicas I	08/03/2010	21/06/2010	30	2	75	A	N	Concluída
FBC5723-4/3	Mecanismos das Interações Patológicas entre Células Endoteliais e Elementos Circulantes e sua Importância em Processos Vaso-oclusivos	05/04/2010	26/04/2010	75	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5708-4/1	Farmacogenômica Cardiovascular	05/05/2010	15/06/2010	90	6	80	A	N	Concluída
FBC5709-4/3	Biologia Molecular em Análises Clínicas	20/09/2010	24/10/2010	75	5	75	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	25	25	29
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	29

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 29/10/2010.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 26/01/2011

Impresso em: 11/07/11 09:38:23

ANEXO 10. Curriculum Vitae

André Ducati Luchessi
Curriculum Vitae

Junho/2011

André Ducati Luchessi

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome André Ducati Luchessi
Filiação Wladimir Luchessi e Maria Cristina Ducati Luchessi
Nascimento 05/04/1982 - São Caetano do Sul/SP – Brasil
Carteira de Identidade 335520935 SSP - SP - 28/03/2006
CPF 30489740839
CRFSP 4129
CAM 04024345341-8
Título de eleitor 2624767101/16 Zona 306 Seção 54
Endereço residencial Rua Desembargador José Gomes da Costa, 1884 apto 1304
Capim Macio – Natal
59082-140, RN – Brasil
Telefone: 11 87442625
Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 17 superior
Butantã – São Paulo
05508-000, SP – Brasil
Telefone: 11 30913660
Endereço eletrônico
e-mail para contato : adluchessi@usp.br
e-mail alternativo : adluchessi@uol.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2008 Doutorado em Ciências Farmacêuticas.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Análise Farmacogenômica de pacientes submetidos à dupla antiagregação plaquetária
Orientador: Mario Hiroyuki Hirata
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2001 – 2008 Graduação em Farmácia Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2006 – 2007 Graduação em Farmácia.
Universidade de Santiago de Compostela, USC, Espanha

Formação complementar

2010 – 2010 Curso de curta duração em Aplicações da Citometria de Fluxo.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2007 – 2007 Curso de curta duração em Aplicación da Bioinformática em Acicultura, a Gripe Aviária (H5N1), Microarray e SNPs.
Universidade de Santiago de Compostela, USC, Espanha
2006 – 2006 Curso de curta duração em I Curso Teórico Atualização em Biologia Molecular.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
2005 – 2005 Extensão universitária em VIII Campanha Nacional Gratuita de Diabetes.
Associação Nacional de Assistência Ao Diabético, ANAD, Brasil
2005 – 2005 Extensão universitária em 5 Campanha de Controle de Diabetes.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil

2005 – 2005	Curso de curta duração em Multiplicadores para Uso Racional Medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, Brasil
2004 – 2004	Extensão universitária em VII Campanha Nacional Gratuita de Diabetes. Associação Nacional de Assistência Ao Diabético, ANAD, Brasil
2004 – 2004	Curso de curta duração em Advanced Laboratory Methods for Identification. Center for Disease Control and Prevention, CDC, Atlanta, Estados Unidos
2003 – 2003	Extensão universitária em VI Campanha Nacional Gratuita Em Diabetes. Associação Nacional de Assistência Ao Diabético, ANAD, Brasil
2003 – 2003	Curso de curta duração em Manuseio e Descarte de Resíduo Biológico. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
2003 – 2003	Extensão universitária em III Campanha de Diabetes. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
2002 – 2002	Extensão universitária em V Campanha Nacional Gratuita Em Diabetes. Associação Nacional de Assistência Ao Diabético, ANAD, Brasil
2002 – 2002	Curso de curta duração em I Curso Interno de Biologia Molecular. Laboratório de Biologia Molecular Aplicada Ao Diagnóstico FCF USP, LABMAD, Brasil
2001 – 2001	Curso de curta duração em Genoma Humano Perspectiva Para Diagnóstico Clínico. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
2001 – 2001	Extensão universitária em I Campanha de Diabetes e Colesterol. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
2001 – 2001	Curso de curta duração em Fatores genéticos que influenciam na resposta terapêutica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
1997 – 1997	Curso de curta duração em Férias na Universidade. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

2002 Universidade de São Paulo – USP

Vínculo institucional

2008 – Atual	Vínculo: Doutorando , Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Integral
2001 – 2006	Vínculo: Aluno de Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

07/2005 – 08/2006	Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Participação em projetos:</i> <i>Construção de um vetor para expressão das proteínas G,M e N do vírus da Raiva na forma de</i> <i>Químera para a utilização no diagnóstico.</i>
07/2004 – 06/2005	Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas <i>Participação em projetos:</i> <i>Nova estratégia de Bacilosopia utilizando proteína verde para identificação</i>

07/2003 – 06/2004 Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Participação em projetos:
Avaliação de um novo método de detecção e identificação do complexo M. tuberculosis e complexo M. avium

07/2002 – 06/2003 Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Participação em projetos:
Padronização de um método de detecção e identificação dos complexos M. tuberculosis e M. avium utilizando PCR competitivo e hibridação com sondas marcadas não radioativas.

09/2001 – 08/2006 Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Estágio:
Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico

2. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – FCF-USP

Vínculo institucional

2002 – 2004 Vínculo: Coordenador , Enquadramento funcional: Coordenador , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

12/2004 – 01/2006 Projetos de pesquisa, Departamento de Farmácia, Laboratório de Captação de Publicidade de Medicamento
Participação em projetos:
II Etapa do Projeto de Captação e Monitoração de Produtos Sujeitos a Vigilância Sanitária

09/2002 – 02/2004 Projetos de pesquisa, Departamento de Farmácia, Laboratório de Captação de Publicidade de Medicamento
Participação em projetos:
I Etapa do Projeto de Monitoração de Propaganda e Publicidade de Medicamentos

3. Uniformed Services University Of The Health Sciences - USUHS

Vínculo institucional

2002 - 2003 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

12/2002 - 02/2003 Estágio, Department Of Medicine, Division Of Nephrology
Estágio:
Division of Nephrology

4. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela - CHUSC

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiario , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

03/2007 - 07/2007 Estágio, Laboratório Central

Estágio:

Estágio no Laboratório Central do Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

5. Grupo de Medicina Xenómica - GMX

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Aluno de doutoramento , Carga horária: 20, Regime: Parcial

6. Complejo Hospitalario Universitario de Vigo - CHUV

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Aluno de doutoramento , Carga horária: 20, Regime: Parcial

7. Universidade de Santiago de Compostela - USC

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Aluno de doutorado , Enquadramento funcional: Aluno , Carga horária: 40, Regime: Integral

Projetos

2005 - 2006 Construção de um vetor para expressão das proteínas G,M e N do vírus da Raiva na forma de Quimera para a utilização no diagnóstico.

Descrição: Construção de um vetor para expressão das proteínas G,M e N do vírus da Raiva na forma de Quimera para a utilização no diagnóstico.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado académico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: André Ducati Luchessi (Responsável); ;

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2004 - 2005 Nova estratégia de Baciloscopia utilizando proteína verde para identificação

Descrição: Nova estratégia de Baciloscopia utilizando proteína verde para identificação

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado académico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: André Ducati Luchessi (Responsável); ;

Financiador(es):

2004 - 2006 II Etapa do Projeto de Captação e Monitoração de Produtos Sujeitos a Vigilância Sanitária

Descrição: II Etapa do Projeto de Captação e Monitoração de Produtos Sujeitos a Vigilância Sanitária

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado académico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: André Ducati Luchessi (Responsável); ;

Financiador(es):

2003 - 2004 Avaliação de um novo método de detecção e identificação do complexo *M. tuberculosis* e complexo *M. avium*

Descrição: Avaliação de um novo método de detecção e identificação do complexo *M. tuberculosis*

e complexo *M. avium*

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: André Ducati Luchessi (Responsável); ;

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2002 - 2003 Padronização de um método de detecção e identificação dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* utilizando PCR competitivo e hibridação com sondas marcadas não radioativas.

Descrição: Padronização de um método de detecção e identificação dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* utilizando PCR competitivo e hibridação com sondas marcadas não radioativas.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: André Ducati Luchessi (Responsável); ;

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2002 - 2004 I Etapa do Projeto de Monitoração de Propaganda e Publicidade de Medicamentos

Descrição: I Etapa do Projeto de Monitoração de Propaganda e Publicidade de Medicamentos

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: André Ducati Luchessi (Responsável); ;

Financiador(es):

Áreas de atuação

1. Propaganda e Publicidade de Medicamento
2. Farmacogenômica
3. Cardiologia Genômica
4. Biologia molecular aplicada ao diagnóstico

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Espanhol Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Português Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Prêmios e títulos

2010 Menção Honrosa, II Simpósio Internacional de Genética Clínica da UFRN

2004 Menção Honrosa, XII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo

2003 Menção Honrosa, XI Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo

2003 Primeiro Lugar na área de Análises Clínicas e Toxicológicas, VIII Semana de Ciência e Tecnologia da FCF-USP

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SILBIGER, VIVIAN NOGUEIRA, **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO, NETO, LIDIO GONÇALVES LIMA, PASTORELLI, CARLA PRISINZANO, UEDA, ERIC K.M., SANTOS, ELIZABETE SILVA DOS, PEREIRA, MARCOS PAULO, RAMOS, RUI, SAMPAIO, MARCELO FERRAZ
Time course proteomic profiling of human myocardial infarction plasma samples: An approach to new biomarker discovery. *Clinica Chimica Acta.* , v.412, p.1086 - 1093, 2011.
2. LIMA NETO, L. G., HIRATA, R. D. C., **LUCHESSI, A. D.**, SILBIGER, V. N., PASTORELLI, C., SAMPAIO, M.F., ARMAGANJAN, D., RESENDE, A.A., HIRATA, M.H.
Detection of the TLR4 1196C>T polymorphism by mismatched-PCR using plasmid DNA as internal control in RFLP assays. *Genetic Testing.* , v.13, p.343 - 347, 2009.
3. BARBOSA, P. R., STABLER, S. P., TRENTI, R., FELIPE, C.R., **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H., ALLEN, R. H., GUERRA-SHINOHARA, E. M.
Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/Sadenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. *Clinica Chimica Acta (Print).* , v.388, p.139 - 147, 2008.
4. SOUSA, E.M., HIRATA, R. D. C., SANTOS, F. C., PICCIOTTI, R., **LUCHESSI, A. D.**, SILBIGER, V. N., RODRIGUES, A. C., SAMPAIO, M. F., ARMAGANJAN, D., Salem, M.H., DOI, S.Q., HIRATA, M.H.
Paraoxonase polymorphisms are associated with nitrate levels and vascular response in young adults with myocardial infarction. *International Journal of Atherosclerosis.* , v.3, p.146 - 154, 2008.
5. SAMPAIO, M.F., HIRATA, M.H., HIRATA, R. D. C., SANTOS, F. C., PICCIOTTI, R., **LUCHESSI, A. D.**, DOI, S.Q., ARMAGANJAN, A., BATLOUNI, M.
AMI is associated with polymorphisms in the NOS3 and FGB but not in PAI-1 genes in young adults.. *Clinica Chimica Acta (Print).* , v.377, p.154 - 162, 2007.
6. **LUCHESSI, A. D.**, MARÇAL, B. F., ARAÚJO, G. F., ULIANA, L. Z, ROCHA, M. R. G., PINTO, T. J. A.i
Monitoração de propaganda e publicidade de medicamento: âmbito São Paulo. RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Cessou em 2008. Cont. ISSN 1984-8250 Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences). , v.41, p.345 - 349, 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **LUCHESSI, A. D.**, SILBIGER, V. N., HIRATA, R. D. C., LIMA NETO, L. G., CARRACEDO, A., BRION, M., IÑIGUES, A., BASTOS. G., BRAVO, M., SOUSA, A.G.M.R., HIRATA, M.H.
Blood transcriptome profile and antiplatelet drug response studies in patients with acute myocardial infarction In: AACC Annual Meeting, 2010, Anaheim.
Clinical Chemistry. Clinical Chemistry, 2010. v.56. p.A91 - A91
2. **LUCHESSI, A. D.**, SILBIGER, V. N., HIRATA, R. D. C., CERDA, A, CARRACEDO, A., BRION, M., IÑIGUES, A., BRAVO, M., BASTOS. G., SOUSA, A.G.M.R., HIRATA, M.H.
Clopidogrel response is affected by ABCC3 expression but not ABCB1 in CAD patients In: Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010, 2010, Santorini Island.
Clinical Chemistry Laboratory Medicine. Berlin: Walter de Gruyter, 2010. v.48. p.A29 - A77
3. LIMA NETO, L. G., HIRATA, R. D. C., LARGURA, A., **LUCHESSI, A. D.**, SILBIGER, V. N., CAVICHIOLO, D. D., SAMPAIO, M.F., ARMAGANJAN, D., SANTOS, E., Pereira M.P., SOUSA, A.G.M.R., DOI, S.Q., RESENDE, A.A., HIRATA, M.H.
Low serum vitamin D is associated with AMI and inflammatory and molecular markers. In: AACC Annual Meeting, 2010, Anaheim.
Clinical Chemistry. Clinical Chemistry, 2010. v.56. p.A153 - A153
4. SILBIGER, V. N., **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., LIMA NETO, L. G., PASTORELLI, C., SANTOS, E., Pereira M.P., SAMPAIO, M.F., ARMAGANJAN, D., PAIK, S. H., MURATA, Y., HIRATA, M.H.
Time course proteomic profiling of human myocardial infarction plasma samples as approach to biomarkers discovers In: AACC Annual Meeting, 2010, Anaheim.
Clinical Chemistry. Clinical Chemistry, 2010. v.56. p.A133 - A133

5. HIRATA, M.H., FA, S., SILVA, F.A., LIMA NETO, L. G., **LUCHESSI, A. D.**, SILBINGER, V. N., RODRIGUES, A. C., BATLOUNI, M., TAVARES, V., RESENDE, A.A., DOI, S.Q., SAMPAIO, M.F., ARMAGANJAN, D., HIRATA, R. D. C.

IL-6 -174G>C gene polymorphism can be a marker of type 2 diabetes mellitus In: AACC Annal Meeting, 2009, Chicago.

Clinical Chemistry. Washington: Clinical Chemistry, 2009. v.55. p.A223 - A223

6. SILBINGER, V. N., **LUCHESSI, A. D.**, LIMA NETO, L. G., SAMPAIO, M.F., PASTORELLI, C., PEREIRA M.P., SANTOS, E., ARMAGANJAN, D., CARRACEDO, A., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.

mRNA Splicing variants observed in peripheral blood from patient cith acute myocardial infarction In: Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, 2009, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009. v.45. p.73 - 73

7. SILBINGER, V. N., **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., CARRACEDO, A., BRION, M., LIMA NETO, L. G., PASTORELLI, C., DOPAZO, J., MONTANER, D., GARCIA, F., SAMPAIO, M.F., Pereira M.P., SANTOS, E., ARMAGANJAN, D., HIRATA, M.H.

Peripheral blood cells transcriptome to study new biomarkers for myocardial infarction follow up In: AACC Annual Meeting, 2009, Chicago.

Clinical Chemistry. Washington: Clinical Chemistry, 2009. v.55. p.A51 - A51

8. LIMA NETO, L. G., HIRATA, R. D. C., **LUCHESSI, A. D.**, SILBINGER, V. N., PASTORELLI, C., SAMPAIO, M.F., ARMAGANJAN, D., DOI, S.Q., RESENDE, A.A., SOUZA, E.B., SPROVIERE, E.S., SANTOS, E., Pereira M.P., HIRATA, M.H.

TLR2 transcription levels in peripheral blood cells but not TLR4, IL-6 and TNF-alpha is associated with acute myocardial infarction In: AACC Annual Meeting, 2009, Chicago.

Clinical Chemistry. Washington: Clinical Chemistry, 2009. v.55. p.A222 - A222

9. LIMA NETO, L. G., HIRATA, R. D. C., **LUCHESSI, A. D.**, SILBINGER, V. N., DOI, S.Q., RESENDE, A.A., ARMAGANJAN, D., SAMPAIO, M.F., STEPHANO, M. A., HIRATA, M.H.

CD 14, TLR 2;TLR 4 and IL-6 gene polymorphisms maybe associated with acute myocardial infarction in young ADULT Patients In: AACC 2008 annual meeting and Clinical Laboratory Exposition, 2008, Washington.

Clinical Chemistry. , 2008.

10. SILBINGER, V. N., **LUCHESSI, A. D.**, LIMA NETO, L. G., PASTORELLI, C., HIRATA, R. D. C., SANTOS, E., SAMPAIO, M.F., AVEZUM, A., PIEGAS, L.S., QUITELA, I., BRION, M., CARRACEDO, A., MONTANER, D., GARCIA, F., DOPAZO, J., HIRATA, M.H.

Functional profiling of the peripheral blood cells transcriptome to study cardiovascular biomarkers In: International Meeting of the Microarray and Gene Expression DATA, 2008, Riva del Garda.

MEGED11. , 2008. p.84 – 84

11. HIRATA, M.H., **LUCHESSI, A. D.**, NOMIYAMA, I. Y., SILBINGER, V. N., LIMA NETO, L. G., SAMPAIO, M.F., ARMAGANIJAN, A., HIRATA, R. D. C.

Detection by Real Time PCR of Streptococcus mutans in Peripheral blood of Yong Myocardium Infarction Patients In: 2007 AACC Annual Meeting, 2007, San Diego.

Clinical Chemistry. , 2007. v.53. p.A55 - A55

12. HIRATA, M.H., SETO, M. Y., HIRATA, R. D. C., NISHIKAWA, A. M., **LUCHESSI, A. D.**, SILBINGER, V. N., LIMA NETO, L. G., TUBERO, V.A., MARCELINO, S. L., De MICHELI, G.

Evaluation of red complex in Brazillian population carried out periodontal disease by Real Time PCR In: 2007 AACC Annual Meeting, 2007, San Diego.

Clinical Chemistry. , 2007. v.53. p.A66 - A66

13. HIRATA, M.H., SOUZA, E. M., SAMPAIO, M. F., ARMAGANIJAN, A., SANTOS, F. C., PICCIOTTI, R., **LUCHESSI, A. D.**, RODRIGUES, A. C., HIRATA, R. D. C.

Evaluation of Paraoxonosase 1 and 2 gens polymorphisms o fthe in young adults whit coronary artery disease In: 2006 AACC Annual Meeting, 2006, Chicago.

Clinial Chemistry. , 2006. v.52. p.A54 - A54

14. SILBIGER, V. N., SOUSA, E.M., SAMPAIO, M.F., ARMAGANIAN, A., SANTOS, F. C., **LUCHESSI, A. D.**, RODRIGUES, A. C., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Paraoxonase 1 e 2 como marcador genético de infarto agudo do miocárdio em adultos jovens In: XXI Seminário de Pós-graduação da FCF/USP, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2006. v.42. p.96 – 96
15. LIMA NETO, L. G., **LUCHESSI, A. D.**, SILBIGER, V. N., SAMPAIO, M.F., ARMAGANIAN, D., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Polimorfismos do gene TLR2 e sua associação com o infarto agudo do miocárdio em adultos jovens In: XI Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia/ XLI SUPFAB, 2006, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2006. v.42.
16. ANAZAIKANTO, E., GOES, C., **LUCHESSI, A. D.**, OLIVEIRA, R. N., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Caracterização e Desenvolvimento de Sistemas de Referências Alélicas dos STR FGA e TH01 do Genoma Humano para controle de Qualidade em Identificação de Indivíduos In: X Semana Farmacêutica de Ciências e tecnologia, 2005, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2005.
17. SILVA, D.K., MASSON, A.S., **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H., ABRAHÃO NETO, J.
Obtenção da L-Asparaginase de *E. coli* por DNA recombinante: Parâmetros Interferentes na Biossíntese In: XII Reunião de Iniciação Científica, 2004, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2004. v.40. p.17 - 17
18. **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., SANTOS, F.C.P., ROCHA, M.R.G., PICCIOTTI, R., SAMPAIO, M.F., ARMAGANIAN, D., DOI, S.Q., HIRATA, M.H.
Otimização de PCR-RFLP e PCR-dHPLC na Detecção do polimorfismo G894T da e-NOS In: XII Reunião de Iniciação Científica, 2004, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2004. v.40. p.4 – 4
19. **LUCHESSI, A. D.**, ROCHA, M. R. G., PICCIOTTI, R., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Desenvolvimento de um Método de Detecção de *M. tuberculosis* e *M. avium* utilizando PCR e Hibridação com Sondas não Radioativas In: VIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2003, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2003. v.39. p.5 - 5
20. ROCHA, M. R. G., SANTOS, F.C.P., **LUCHESSI, A. D.**, COLOMBO, S., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Elaboração de Controle interno para Detecção de *C. Pneumoniae* em Amostras Clínicas In: X Reunião de Iniciação Científica, 2002, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP, 2002. v.38. p.26 – 26
21. ROCHA, M. R. G., **LUCHESSI, A.D.**, SANTOS, F.C.P., HIRATA, M.H., HIRATA, R. D. C., COLOMBO, S.
Elaboração de controle interno para Detecção de *C. pneumoniae* em amostras Clínicas In: XXXVI Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina laboratorial, 2002, São Paulo.
Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Rio de Janeiro: SBPC/ML SBP e SBC, 2002. v.38. p.47 – 47
22. TAVARES, V., SPERANZA, A. C., **LUCHESSI, A. D.**, SALLES, J.E. N., ROCHA, M. R. G., HIRATA, M.H., MONTE, O., HIRATA, R.D. C.
Otimização da PCR-SSCP na Detecção de Mutações no gene do PPAR gama (peroxisome proliferator-activated receptor gamma); avaliação em pacientes com Diabetes melito do tipo 2 (DM2). In: XXXVI Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina laboratorial, 2002, São Paulo.
Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Rio de Janeiro: SBPC/ML SBP e SBC, 2002.

Apresentação de Trabalho

1. BEZERRA, J F, CARDOSO, M L, OLIVEIRA, R. N., OLIVEIRA, G H M, SOARES, C D, **LUCHESSI, A. D.**, LIMA NETO, L. G., HIRATA, M.H., HIRATA, R. D. C., ALMEIDA, M G, RESENDE, A.A.
Study of Polymorphisms C667T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in patients with nonsyndromic oral clefts In: XXXIX Annual Meeting of SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. XXXIX Annual Meeting of SBBq. , 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
2. BEZERRA, J F, CARDOSO, M L, OLIVEIRA, G H M, SOARES, C D, URURAHY, M A G, OLIVEIRA, S R, **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, M.H., HIRATA, R. D. C., ALMEIDA, M G, RESENDE, A.A.
Estudo de polimorfismos Relacionados ao metabolismo do ácido fólico em pacientes portadores de fendas orais não-sindromicas, 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
3. **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Avaliar a Metodologia de Hibridização Líquida de ácidos nucleicos, pela comparação com a PCR-multiplex, para a inclusão dessa nova técnica na Rotina Laboratorial. In: 12º Jornada de Iniciação Científica, 2005, Fortaleza.
57º Reunião Anual da SBPC. , 2005. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
4. **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Nova estratégia para detecção de Mycobacteria, 2005. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
5. **LUCHESSI, A. D.**, ROCHA, M. R. G., PICCIOTTI, R., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Desenvolvimento de um método de detecção de *M. Tuberculosis* e *M. Avium* utilizando PCR hibridização com sondas não radioativas In: 11º Jornada Nacional de Iniciação Científica, 2004, Cuiabá.
56º Reunião Anual da SBPC. , 2004. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
6. **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., ROCHA, M.R.G., PICCIOTTI, R., HIRATA, M.H.
Desenvolvimento de um método de de tecção de *M. Tuberculosis* e *M. Avium* utilizando PCR e hibridização com sondas não radioativas, 2004. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
7. **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Diagnóstico molecular da Tuberculose pela PCR-multiplex com detecção por hibridização líquida, 2003. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
8. **LUCHESSI, A. D.**, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M.H.
Nova Estratégia para o Diagnóstico Molecular da Tuberculose In: II Congresso de Infectologia do Cone Sul, 2004, São Paulo.(Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Produção Técnica

Cursos e palestras ministrados

1. **LUCHESSI, A. D.**
Bancos de dados de genomas, transcriptomas e proteomas, 2010. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
2. **LUCHESSI, A. D.**, SILBIGER, V. N.
Curso de Biologia Molecular – DNA na pratica - teórico/prático, 2010. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
3. **LUCHESSI, A. D.**
Bioinformática em cardiologia, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
4. **LUCHESSI, A. D.**
Estudo transcriptômico pós-infarto de pacientes com dupla medicação antiagregante plaquetários, 2009. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
5. **LUCHESSI, A. D.**

III Curso de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico - teórico/prático, 2009. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

6. **LUCHESSI, A. D.**

Noções de Proteoma nas Principais Doenças Cardiovasculares, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

7. **Luchessi, A. D.**

Planejamento de projetos Genômicos, Transcriptômicos e Proteômicos, 2009. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

8. **Luchessi, A. D.**

Curso de Biologia Molecular, 2007. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

9. **LUCHESSI, A. D.**

Intercâmbio na Graduação, 2007. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

10. **Luchessi, A. D.**

I Curso de Atualização em Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, 2006. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

11. **LUCHESSI, A. D.**

Projeto Monitoração de Propaganda - Fase II, 2006. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

12. **LUCHESSI, A. D.**

V Curso de Investigação Científica Criminal, 2006. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

13. **LUCHESSI, A. D.**

Monitoração de Propaganda, 2005. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

14. **LUCHESSI, A. D.**

Monitoramento de Propaganda de Medicamentos - Apresentação de dados do projeto desenvolvido pela Universidade de São Paulo, 2005. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

15. **LUCHESSI, A. D.**

Apresentação do Projeto de monitoramento de propaganda de medicamento ANVISA-USP, 2004. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

16. **LUCHESSI, A. D.**

Workshop monitoração de propaganda e publicidade de medicamentos, 2004. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Desenvolvimento de material didático ou instrucional

1. **LUCHESSI, A.D.**

Introducción á toxicología analítica, 2009 (Material didático digital)

Eventos

Participação em eventos

1. **Motores do Desenvolvimento do Rio Grande do Norte - Seminário Inovação e Tecnologia**, 2011. (Seminário)

2. **AACC 2010 Annual Meeting and Clinical Laboratory Exposition**, 2010. (Congresso)

3. **VIII Simpósio de Biosegurança e descartes de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa**, 2009. (Simpósio)

4. **Product Show: Pirosequenciamento uma nova abordagem molecular**, 2009. (Oficina)

5. **I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área Análises Clínicas**, 2009. (Simpósio)
6. **I Jornada Gallega de Bioinformática**, 2008. (Simpósio)
7. **Estudios de asociación en Cáncer: Desde genes candidatos a GWAs**, 2008. (Seminário)
8. **Seminário da Comissão de Pesquisa: Lípidos e ativação de processos inflamatórios no desenvolvimento da doença renal crônica**, 2007. (Seminário)
9. **Mini-Simpósio: Cloning and gene expression techniques: Fundamentals and application**, 2006. (Simpósio)
10. **Seminário da Comissão de Pesquisa: Inflammataion as pathogenic cause in cardiovascular disease**, 2006. (Seminário)
11. **Simpósio da Comissão de Pesquisa: Novas estratégias para reparação cardíaca baseada em terapia gênica/celular**, 2006. (Seminário)
12. **Seminário da Comissão de Pesquisa: O gene supressor de tumor e metástase *reck* e seu potencial para marcador diagnóstico**, 2005. (Seminário)
13. **V Simpósio de Biossegurança e Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituição de Ensino e Pesquisa**, 2005. (Simpósio)
14. **Seminário da Comissão de Pesquisa: Propaganda e Publicidade de Medicamento**, 2005. (Seminário)
15. **Seminário da Comissão de Pesquisa: Assistência Farmacêuticas, Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica**, 2005. (Seminário)
16. **57º Reunião Anual da SBPC**, 2005. (Congresso)
17. **I Fórum de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, 2004. (Outra)
18. **9 Congresso Brasileiro multidisciplinar e profissional em Diabetes**, 2004. (Congresso)
19. **56ª Reunião Anual da SBPC**, 2004. (Congresso)
20. **Seminário da Comissão de Pesquisa: Potencial de Utilização de Lactobacilos no Tratamento e Prevenção de Doenças do Trato Intestinal e Geniturinário**, 2004. (Seminário)
21. **Seminário da Comissão de Pesquisa: Molecular Signature of Pathogens Exposure**, 2004. (Seminário)
22. **II Congresso de Infectologia do Cone Sul da API**, 2004. (Congresso)
23. **IV Simpósio de Biossegurança e Descartes de produtos Químicos perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2003. (Simpósio)
24. **Seminário da Comissão de Pesquisa: O Romantismo, a reinvenção da música**, 2003. (Seminário)
25. **Seminário da Comissão de Pesquisa: Mecanismo Molecular Envolvidos no Desenvolvimento da Doença Renal Crônica.**, 2003. (Seminário)
26. **Seminário da Comissão de Pesquisa Pneumonia Asiática: Vírus SARS**, 2003. (Seminário)
27. **Seminário da Comissão de Pesquisa: Caracterização Molecular de Genes Preferencialmente Expressos na Fase Leveduriforme Patogenica de *Paracoccidioides Brasiliensis*.**, 2003. (Seminário)

28. **Seminário da Comissão de Pesquisa: O que a Pró-Reitoria de Pesquisa pode fazer por você**, 2003. (Seminário)

29. **XIII Congresso Paulista de Farmacêuticos V Seminário Internacional de Farmacêuticos Expofar 2003**, 2003. (Congresso)

30. **XXXVI Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial**, 2002. (Congresso)

31. **Workshop sobre Implantação das Diretrizes Curriculares para Curso de Farmácia nas Universidades Públicas Paulistas.**, 2002. (Outra)

32. **XXXVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2001. (Outra)

33. **II Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2001. (Simpósio)

Organização de evento

1. **LUCHESSI, A. D.**

II Simpósio Internacional de Genética Clínica da UFRN, 2010. (Outro, Organização de evento)

2. **LUCHESSI, A. D.**

XV Congresso Paulista de Farmacêuticos e VII Seminário Internacional de Farmacêuticos, 2007. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. RESENDE, A.A., MACHADO, P.R.L., **LUCHESSI, A. D.**

Participação em banca de Karla Simone Costa de Souza. **Study of IL-6 -174G>C polymorphism by RFLP and allelic discrimination Taqman Real-time PCR tecnouques in type 1 Diabetic Patients**, 2011 (Farmácia) Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Comissões

Participação como membro eleito em comissões

1. **LUCHESSI, A.D.**

Participação em comissão de colegiado como representante dos alunos. **Congregação** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2004-2005

2. **LUCHESSI, A.D.**

Participação em comissão de colegiado como representante dos alunos. **Conselho Técnico-Administrativo**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2005-2006

Citações em bases bibliográficas

Web of Science Número total de citações: 3;Número de trabalhos: 3 Data: 12/05/2011; Fator H: 2; Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações: Luchessi A.D.