MÔNICA MARIA CARTOCCI

Avaliação farmacogenética do ácido acetilsalicílico em uso isolado e associado aos ácidos graxos ômega 3 (n-3) em pacientes com doença arterial coronária crônica

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Entidade Associada da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia.

Orientador: Prof. Dr. Dikran Armaganijan

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca do IDPC)

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Cartocci, Mônica Maria

Avaliação farmacológica do ácido acetilsalicílico em uso isolado e associado aos ácidos graxos ômega 3 (n-3) em pacientes com doença arterial coronária crônica/Mônica Maria Cartocci. -- São Paulo, 2016.

Tese (doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia Universidade de São Paulo

Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Dikran Armaganijan

Descritores: 1. Doença Coronária Crônica 2. Farmacogenética. 3. Ácido Acetilsalicílico. 4. Ácidos Graxos Ômega-3. 5. Agregação Plaquetária. 6. Polimorfismo Genético.

USP/IDPC/Biblioteca/056/15

Para meus pais, Maria Aparecida e Romano, que possibilitaram a realização deste trabalho por meio de seu apoio e de seus exemplos de integridade, honestidade, humildade, trabalho e ética, valores sempre presentes em minha formação tanto pessoal como profissional.

Para minha irmã querida Patricia Maria, sempre presente com seu carinho, determinação e apoio incondicional na luta pelos meus ideais.

In Memoriam

Aos meus avós (Maternos): Isabel Lucente Checchio

Ricardo Omeletto Checchio

(Paternos): Elvia Maccari Cartocci

Aleardo Antônio Cartocci

Como fonte inspiradora: Professor Doutor Abraham Pfeferman

Professor Doutor Dirceu Vieira dos Santos Filho

Professor Doutor Euryclides de Jesus Zerbini

Professor Doutor Luiz Venere Décourt

Esta singela homenagem.

AGRADECIMENTOS

Soli Deo convenit gloria.

Gratias Autem Deo In Christo Iesu Domino Nostro.

Ao meu orientador, Professor Doutor Dikran Armaganijan, possuidor de sólido saber, pela orientação desta Tese.

A Professora Doutora Amanda Guerra de Moraes Rego Sousa, pelo incentivo e amizade, bem como a todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Cardiologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pelas aulas ministradas pontuadas pelo conhecimento e alto nível científico.

Agradeço aos Professores Doutor José Eduardo Moraes Rego Sousa, Doutora Magaly Arrais e Doutor Jarbas Jakson Dinkhuysen pela excelência e incentivo.

Ao Professor Doutor Michel Batlouni, pela honrosa presença na banca de qualificação desta Tese, e pela minuciosa e valorosa correção do trabalho.

Ao Professor Doutor Ari Timerman, pela honrosa presença na banca de qualificação desta Tese, pelo estímulo, pelo incentivo e pelas correções do trabalho.

Ao Professor Doutor Eulógio Emílio Martinez, pela honrosa presença na banca de qualificação desta Tese e pelos sábios conselhos para a execução do trabalho.

À Comissão de Pós-Graduação do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pela organização do Curso.

Ao Professor Doutor Mário Hiroyuki Hirata, por compartilhar o aprendizado tanto na Biologia Molecular como na Genética, aplicadas à Cardiologia Clínica, meu agradecimento.

À Doutora Gisele Medeiros Bastos, pela dedicação e assistência no desenvolvimento desta Tese.

Ao Biologista Molecular, Pesquisador, Farmacêutico e também Doutorando pela Universidade de São Paulo, Thiago Dominguez Crespo Hirata, pela disponibilidade e pelo incentivo.

À senhorita Elisangela Silva Rodrigues, pela atenção, dedicação, colaboração, tanto para com o atendimento dos pacientes, bem como com a parte experimental e digitação.

À senhorita Jéssica Bassani Borges, pela atenção.

À Doutora Hui Tzu-Lin Wang, pela disponibilidade.

À senhora Adriana Regina Garofalo, pela atenção.

À Doutora Rosário Dominguez Crespo Hirata, pela disponibilidade.

À Equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia: Doutora Gisele Medeiros Bastos, Doutora Hui Tzu-Lin Wang, Adriana Regina Garofalo, Elisangela Silva Rodrigues, Jéssica Bassani Borges, Thaís Almendros, senhora Ana Cristina, senhora Elisa, Guilherme, Aécio, Victor, senhora Helena, pela disponibilidade, pela atenção e pelo carinho.

Às senhoras Néia e Sara, pela realização da coleta dos exames laboratoriais dos pacientes da pesquisa.

Às senhoras Nádia, Carmem, Maria, pela recepção aos pacientes.

Ao senhor Eduardo, pela disponibilidade.

À Professora Doutora Clarisse Kaoru Ogawa Índio do Brasil, pela colaboração junto à seleção dos pacientes para a pesquisa.

Às senhoras Juliana e Simone pela colaboração.

Ao Professor João Ítalo Dias França, pela análise estatística.

À Doutora Simone Sorkin Arazi, que iniciou o trabalho, pelo incentivo.

Ao Professor Doutor Marcelo Ferraz Sampaio, pelo incentivo.

Às Dras Valeria e Soraya, do setor de Coronariopatias do IDPC, que me incentivaram.

À senhora Anna Simene Leite e a toda equipe da Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pela colaboração.

Às senhoras Valquíria Dias e Janeide Alves, pela atenção e disponibilidade.

À senhora Mabília, pela atenção.

Às senhoras Joseane e Sandra (CEP) pela atenção.

Aos Pacientes do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, motivo maior da minha missão como Médica e sem os quais esta Tese não seria possível.

À senhora Marlene Abdo Jaquery, pela preciosa e eterna amizade, minha segunda Mãe.

À Doutora Dulce Terezinha Tardelli, pelo meu acompanhamento.

Às Dras. Mabel e Lilian, da Anatomia Patológica, pelo aprendizado no setor.

Ao Pastor Willian Fawcett e à senhora Mary Fawcett, pelo suporte e pelas orações.

À Professora Ivana Ribeiro, pelo auxílio oportuno.

À senhora Simone Cruz, pelo auxílio na qualificação

À senhora Ana Cristina, do LIMC, pela colaboração na qualificação.

"Creio na Medicina que, sendo técnica e conhecimento é também ato de solidariedade e de afeto; que é dádiva não apenas de ciência, mas ainda de tempo e de compreensão; que sabe ouvir com interesse, transmitindo ao enfermo a segurança de que sua narração é recebida como o fato mais importante desse momento. Medicina que é amparo para os que não tem amparo; que é certeza de apoio dentro da desorientação, do pânico ou da revolta que a doença traz. Na Medicina que serve aos doentes e nunca se serve deles".

Prof. Dr. Luiz Venere Décourt (HCFMUSP - Agosto, 1970)

"A vida é curta, a Arte é longa, a ocasião fugidia, a experiência enganadora, o julgamento difícil. É preciso que se faça não apenas o que convém, mas também com que o doente, os assistentes e as coisas exteriores concorram para isso".

"Primum non nocere"

Hipócrates de Cós (460 a.C. – 377 a.C.)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Benefícios terapêuticos do ácido acetilsalicílico	5
1.2 Prevenção primária da aterosclerose	5
1.3 Prevenção secundária da aterosclerose	6
2 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	9
2.1 Farmacocinética	9
2.2 Farmacodinâmica.....	10
2.3 Posologia do ácido acetilsalicílico	13
2.4 Efeitos do ácido acetilsalicílico: dose-dependentes	14
2.4.1 Efeitos adversos	14
2.5 Baixa resposta ao ácido acetilsalicílico	15
3 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA 3 (AGW - 3)	17
4 MONITORAMENTO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	22
5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS COM A BAIXA RESPOSTA AO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO "EX VIVO"	27
5.1 Implicações genéticas do polimorfismo	31
6 HIPÓTESE	34
7 OBJETIVOS	36
7.1 Objetivo primário.....	36
7.2 Objetivos secundários	36
8 JUSTIFICATIVA.....	38
9 CASUÍSTICA	40

9.1 Delineamento do estudo e população	40
9.1.1 Critérios de inclusão.....	40
9.1.2 Critérios de exclusão	40
9.1.3 Critérios de interrupção do estudo	41
10 ASPECTOS ÉTICOS	43
11 MÉTODOS	45
11.1 Avaliação clínica e segmento	45
11.1.1 Amostras biológicas e determinações laboratoriais	46
11.2 Análise da função plaquetária	46
11.3 Determinação plasmática de Tromboxane B2.....	49
11.4 Análise de polimorfismos.....	50
11.5 Técnicas de Biologia Molecular	50
11.5.1 Extração do DNA genômico	50
11.5.2 Sequenciamento de <i>Sanger</i>	51
11.5.3 Reação em cadeia da polimerase.....	51
11.5.4 Reação de sequenciamento	52
11.5.5 PCR em tempo real	55
12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
13 RESULTADOS.....	60
13.1 Dados biodemográficos.....	60
13.2 Determinações laboratoriais	62
13.3 Genotipagem.....	64
13.4 Respondedores <i>versus</i> não respondedores	65
13.5 Grupo AAS200 versus grupo ômega 3	66
13.6 Análise de agregação plaquetária e dosagem de tromboxane B2.....	67
14 DISCUSSÃO	74
15 LIMITAÇÕES.....	83
16 IMPLICAÇÕES	85
17 CONCLUSÕES	88
18 SEQUÊNCIA	90
19 ANEXOS	92
19.1 ANEXO A – Multiplate mostrando os tipos de registro de curva do ASPIteste e TRAPteste	92
19.2 ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética Médica.....	93

19.3 ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	95
19.4 ANEXO D - Protocolo dos Exames Laboratoriais e Instruções para Coleta	100
19.5 ANEXO E - Orientações Médicas para o Paciente Ômega 3	101
19.6 ANEXO F- Orientações Médicas para o Paciente AAS 200	102
19.7 ANEXO G- Questionário Clínico (Versão 2.0) : Projeto de Pesquisa: AAS 2 - "Avaliação farmacogenética da aspirina em pacientes portadores de doença arterial coronária crônica" (N° CEP: 4369)	103
19.8 ANEXO H - Multiplate mostrando os tipos de registro de curva do ASPIteste e TRAPteste -	107
19.9 ANEXO I - Curvas de Genotipagem	111
19.10 ANEXO J - Protocolo para PCR	113
20 REFERÊNCIAS	115

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS	ácido acetilsalicílico
ADP	difosfato de adenosina
AFIP	Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa
AG	ácido graxo
AINH	anti-inflamatorios não hormonais
AMP	monofosfato cíclico de adenosina
APS	adenosina 5-fosfosulfato
ASPI	reativo de ácido araquidônico liofilizado
ATP	trifosfato de adenosina
AUC	área sob a curva
AVE	acidente vascular encefálico
CC	citossina citossina
COX-1	enzima ciclo-oxigenase-1
COX-2	enzima ciclo-oxigenase-2
CPG	Comissão de Pós-Graduação
DAC	doença arterial coronária
DHA	ácido docosahexaenoico (22:6n-3) ou ácido cervônico
dNTP	desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	ácido etilenodiamino tetra acético
EPA	ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) ou ácido timnodoico
FvW	fator de <i>VonWillebrand</i>
GPIIIa	glicoproteína
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	lipoproteína de alta densidade
HPAI	antígeno I plaqueta humana
IAM	infarto agudo no miocárdio

ICT	isquemia cerebral transitória
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IMC	Índice de Massa Corpórea
ISIS-2	Segundo Estudo Internacional de Sobrevivência do Infarto
IUPAC	Instituto Internacional de Química Pura Aplicada
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia
LTA	agregômetro por transmissão de luz
nm	nanômetro (comprimento de onda de radiofrequência)
p	probabilidade de ocorrência ao acaso (nível descritivo)
pb	pares de bases
PCRq	reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
PCR-us	proteína C reativa ultra-sensível
PDX	poxitinas
PFA 100	<i>Platelet Function Analyser</i>
PGD2	prostaglandina D2
PGE2	prostaglandina E2
PGF2 α	prostaglandina F2 α
PGH1	prostaglandina H-sintase 1
PGH2	prostaglandina H-sintase 2
PIA	antígeno plaqueta específico
PPi	pirofosfato
q	1-p (intervalo de valores para diferenças não significantes representando um intervalo de confiança)
RR	risco relativo
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TC	timina citosina
TCLE	termo de consentimento livre esclarecimento
TEG	tromboelastograma
Tg	triglicerídeo

TGO/AST	transaminase glutâmico oxalacética/aspartato aminotransferase
TGP/ALT	transaminase glutâmico pirúvica/alanina aminotransferase
TRAP	teste para a estimulação plaquetária via receptor de trombina
TT	timina timina
TXA2	tromboxane A2
TBX 2	tromboxane B2
VASP	vaso dilatador estimulado por fosfoproteína
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa
VNTR	número variável de sequência repetitiva
X ²	quiquadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
+	adição
<	menor
>	maior
↑	aumento
Ω	ômega (alfabeto grego)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do ácido acetilsalicílico.....	10
Figura 2	Esquema representativo dos mecanismos de ação do Ácido Acetilsalicílico no metabolismo do Ácido Araquidônico.	11
Figura 3	Esquema representativo da inibição da ciclo-oxigenase pelo ácido acetilsalicílico	12
Figura 4	Estrutura química dos Ácidos Graxos Ômega 3.....	18
Figura 5	Esquema representativo da produção das prostaglandinas a partir do ácido docosa-hexaenoico (Chen <i>et al.</i> , 2011).....	20
Figura 6	Vias de agregação plaquetária	23
Figura 7	Fotografia mostrando o aparelho utilizado para medir a agregação plaquetária – Multiplate (Peerschke <i>et al.</i> , 2014).....	47
Figura 8	Mecanismo da ativação plaquetária (inibição do ácido acetilsalicílico pela ciclo-oxigenase 1 e outras vias de ativação plaquetária e seus inibidores) (Hecker <i>et al.</i> , 1991)	49
Figura 9	Seleção dos genótipos do polimorfismo rs 3842787C>T do gene <i>PTGS1</i>	53
Figura 10	Seleção dos genótipos do polimorfismo rs 3842798 C>T do gene <i>PTGS1</i>	54
Figura 11	Seleção dos genótipos do polimorfismo rs 5918 T>C do gene <i>ITGB3</i>	55
Figura 12	Comparação do efeito do tratamento sobre a função plaquetária e produção de TBX2.....	68
Figura 13	Comparação dos resultados de função plaquetária e produção de tromboxano B2 entre grupos respondedores (R) e não respondedores (NR).....	69
Figura 14	Efeito do tratamento sobre função plaquetária e concentração plasmática de Tromboxano B2 em respondedores e não respondedores ao AAS.	70

Figura 15	Efeito do tratamento sobre função plaquetária e concentração plasmática de Tromboxane B2 em respondedores (R) e não respondedores (NR) ao AAS.....	71
------------------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação das regiões contendo os polimorfismos 51
-----------------	--

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos polimorfismos e especificações dos ensaios utilizados na genotipagem pela PCRq.....	56
Tabela 2	Características biodemográficas da população do estudo	60
Tabela 3	Principais sinais e sintomas da população do estudo	61
Tabela 4	Histórico de doenças dos pacientes nos grupos AAS 200 e O3	61
Tabela 5	Fatores de risco para doença cardíaca	62
Tabela 6	Dados laboratoriais da população de estudo	63
Tabela 7	Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos rs3842787 e rs3842798 no gene <i>PTGS</i> e, rs5918 no gene <i>ITGB3</i> na população do estudo	65
Tabela 8	Comparação das frequências genotípicas para os polimorfismos rs3842787 e rs3842798 no gene <i>PTGS1</i> e no rs5918 no gene <i>ITGB3</i> entre os grupos de respondedores e não respondedores ao AAS100	66
Tabela 9	Comparação das frequências genotípicas para os polimorfismos rs3842787 e rs3842798 no gene <i>PTGS1</i> e no rs5918 no gene <i>ITGB3</i> entre os grupos AAS200 e O3	67
Tabela 10	Avaliação da correlação entre os resultados de ASPIteste e concentração plasmática de tromboxane B2	68
Tabela 11	Avaliação da correlação entre os resultados de ASPIteste e concentração plasmática de tromboxane B2	69
Tabela 12	Efeito do alelo raro sobre os resultados de ASPIteste e concentração plasmática de tromboxane B2 (TBX2).....	72

RESUMO

Cartocci MM. *Avaliação farmacogenética do ácido acetilsalicílico em uso isolado e associado aos ácidos graxos ômega 3 (n-3) em pacientes com doença arterial coronária crônica* [Tese]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Entidade Associada da Universidade de São Paulo; 2016.

O uso do ácido acetilsalicílico, universalmente aceito na prevenção e tratamento da doença aterosclerótica, pode resultar em respostas terapêuticas variáveis classificando os pacientes em respondedores (normais) ou baixo respondedores (resistentes). A dose de 100mg/dia pode inibir de forma insuficiente a agregação plaquetária. Por isso, doses maiores têm sido utilizadas ou, eventualmente, associadas a outros antiplaquetários visando à redução do número de baixo respondedores. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do ácido acetilsalicílico na redução da agregação plaquetária *in vitro*. Para tal, 152 indivíduos de ambos os sexos, não aparentados, de qualquer etnia, sem limite de faixa etária, portadores de doença arterial coronária crônica, atendidos no Ambulatório de Coronariopatias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, foram incluídos no estudo. Na primeira consulta, todos foram submetidos à anamnese e exame clínico completo e estavam em uso prévio de ácido acetilsalicílico 100mg/dia, por um período superior a 30 dias. Os pacientes selecionados foram divididos em dois grupos: grupo AAS 200, composto por aqueles que foram tratados com ácido acetilsalicílico na dose de 200mg/dia e grupo Ômega 3 composto por aqueles tratados com ácido acetilsalicílico 100mg/dia em associação a ácido graxo ômega 3 na dose de 1.000mg/dia. A agregação plaquetária foi mensurada, *in vitro*, pelo agregômetro *Multiplate*, na primeira e segunda consulta. Adicionalmente, amostras de sangue foram obtidas para análise bioquímica e identificação dos polimorfismos nos genes COX-1 (rs 384787; rs 3842798) relacionado com a atividade do ácido acetilsalicílico e ITGB 3 relacionado com a codificação da glicoproteína IIIa (GPIIIa-rs 5918), subunidade do receptor de fibrogênio. Análise da função plaquetária (*Aspitest*) foi realizada em ambos os grupos. Os valores de corte para o *Aspitest*, relativo à medida de inibição da ciclooxygenase 1 pelo ácido acetilsalicílico, foram: ≤ 30 AUC para os muito bons respondedores, > 30 e ≤ 40 AUC para os bons respondedores e > 40 AUC para os não respondedores. Para a dosagem plasmática de tromboxane, utilizou-se o kit *Elisa* e, para sua qualificação, a espectrofotometria. Para o DNA genômico, extraído do sangue total periférico, utilizou-se o sistema automatizado QIA cube seguido pela amplificação, pela PCR, da região do DNA que continha o polimorfismo. Os dados foram analisados pelo software SPSS-20 e o nível de significância adotado de 5% ($p < 0,05$). O teste paramétrico t *Student* foi utilizado para os dados com distribuição normal (teste Kolmogorov-Smirnov) e os testes não paramétricos *Mann-Whitney* ou *Wilcoxon* para os demais dados. A

frequência das variáveis qualitativas foi determinada pelo teste do *qui-quadrado*. A redução dos níveis séricos de VLDL e triglicérides foram semelhantes nos dois grupos e a redução do número de monócitos foi estatisticamente maior no grupo ômega 3. Dos 152 pacientes incluídos no estudo, 38 (25,2%) não eram respondedores ao tratamento prévio com o ácido acetilsalicílico, na posologia de 100mg/dia. A frequência genotípica e alélica dos polimorfismos e a presença do alelo raro foram semelhantes nos grupos respondedor e não respondedor ao ácido acetilsalicílico. A função plaquetária e a produção de tromboxane foram semelhantes nos grupos AAS 200 e Ômega 3. A redução do *Aspitest* foi observada apenas no grupo não respondedor. A presença do alelo raro do polimorfismo rs 3842787 (gene PTGS1) associou-se à pior resposta do *Aspitest* e o alelo raro do polimorfismo rs 5918 (gene ITGB3) associou-se à pior resposta à concentração de tromboxane, após 30 dias de tratamento. Em conclusão, 1) os resultados desse estudo mostraram que a associação do ácido acetilsalicílico na dose de 100mg/dia e ômega3 na dose de 1.000mg/dia não reduziu a agregação plaquetária *in vitro*; 2) os pacientes não respondedores que fizeram uso de ácido acetilsalicílico na dose de 200mg/dia, após 30 dias, tiveram redução no *Aspitest* e passaram a ser considerados respondedores; 3) A presença dos alelos rs 384787 (COX1-PTGS1) foi responsável pela pior resposta ao *Aspitest* e a do alelo rs 5918 pela pior resposta ao tromboxane B2. A farmacogenética abre novas perspectivas para o tratamento clínico personalizado da antiagregação plaquetária.

Descritores: Doença Arterial Coronária Crônica. Farmacogenética. Ácido Acetilsalicílico. Ácido Graxo Ômega 3. Agregação Plaquetária. Polimorfismo Genético.

ABSTRACT

Cartocci MM. *Pharmacogenetic assessment of aspirin only and in addition to omega 3 fatty acids (n-3) in patients with chronic coronary artery disease* [Thesis]. São Paulo: Institute Dante Pazzanese Cardiology - Associated Entity of the University of São Paulo; 2016.

The use of acetylsalicylic acid for the prevention and treatment of atherosclerotic disease may result in different therapeutic responses. Based on that, patients are classified in responders (normal) or low responders (resistant). In clinical practice, the use of 100mg/daily of acetylsalicylic acid may be insufficient for platelet aggregation inhibition, therefore either higher doses or combination with other antiplatelet agents have been used in order to reduce the rates of low responders. The aim of the present study was to evaluate the effects of acetylsalicylic acid in reducing platelet aggregation *in vitro*. One hundred, fifty-two subjects of both genders, unrelated, of any ethnicity, at any age, and with diagnosis of chronic coronary artery disease followed at the Coronary Artery Disease Section of Dante Pazzanese Institute of Cardiology were included in the study. All patients underwent anamnesis and clinical examination at first consultation. All subjects were on aspirin use (100mg/daily) for at least 30 days before inclusion. Patients were divided into two groups: group ASA, composed by those treated with 200mg of acetylsalicylic acid only and group Omega 3, composed by those treated with 100mg of acetylsalicylic acid in addition to 1.000 mg of omega 3 fatty acid. Platelet aggregation was measured by Multiplate aggregometer at first and second visits. In each visit, blood samples were obtained for biochemical analysis and identification of gene polymorphisms of COX-1 (RS 384 787; rs 3842798) related to the activity of acetylsalicylic acid and of 3 ITGB related glycoprotein IIIa (GPIIIa RS-5918) coding. Platelet function was also analyzed. Cut-off values for Aspitest related to inhibition of cyclooxygenase 1 by acetylsalicylic acid were ≤ 30 AUC for very good responders, $> 30 \leq 40$ AUC for good responders, and > 40 AUC for non-responders. Elisa test was used for thromboxane plasmatic dosage assessment whereas spectrophotometry was used for its quality evaluation. For genomic DNA extracted from peripheral whole blood, we used QIA cube automated system followed by the amplification by PCR of the region of DNA containing the polymorphism. Data was analyzed by SPSS-20 software. P values < 0.05 were considered statistically significant. Parametric Student t test was used for data with normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test) and non-parametric Mann-Whitney or Wilcoxon for other data. The frequency of qualitative variables was analyzed using chi-square test. There was a reduction of VLDL and triglycerides serum levels in both groups, however, the reduction of monocytes was statistically higher in Omega 3 group. Out of 152 patients included in the study, 38 (25.2%) were non responders to prior

treatment with acetylsalicylic acid (100mg/daily). Genotypic and allelic polymorphism frequencies and the presence of the rare allele were similar in the responder and non-responder groups. Platelet function and thromboxane production were similar between groups ASA and Ômega 3. Aspitest reduction was observed only in the non-responder group. The presence of rare allele of rs 3842787 polymorphism (PTGS1 gene) was associated with worse response to Aspitest whereas the presence of rare allele of rs 5918 polymorphism (ITGB3 gene) was associated with poor response to thromboxane concentration. In conclusion, 1) the combination of aspirin 100mg/daily and omega 3 1.000 mg/daily did not reduce platelet aggregation *in vitro*; 2) Non-responders who received aspirin 200mg/daily presented reduction in the Aspitest and were considered responsive after 30 days of treatment; 3) The presence of the alleles rs 384,787 (COX1-PTGS1) was associated with worse response to Aspitest and the presence of the allele rs 5918 was associated with worst response to thromboxane B2. More data is needed to confirm our results. The pharmacogenetics will be an important tool for clinicians in order to customize specific treatment for each patient in platelet aggregation.

Descriptors: Chronic Coronary Artery Disease. Pharmacogenetics. Acetylsalicylic Acid. Omega 3 Fatty Acid. Platelet Aggregation. Genetic Polymorphisms.

1 INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma alteração sistêmica difusa que acomete vasos arteriais de grande e médio calibre, comprometendo os territórios da circulação coronária (Harvey, 1928), cerebral e periférica. O principal mecanismo fisiopatológico da aterosclerose é a inflamação crônica (Ross, 1999) causada pelo depósito de lipídios, o qual propicia a formação do trombo oclusivo. As sequelas clínicas da trombose arterial (*Antitrombotic Trialists Collaboration*, 2002) aguda são o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular encefálico, as causas mais comuns de morbidade e mortalidade do mundo industrializado. Como consequência clínica da trombose arterial crônica, há a doença arterial coronária crônica (angina estável, miocardiopatia isquêmica) (Wright & Merrilees, 2004). Os eventos trombóticos arteriais agudos são caracterizados pela ruptura ou erosão da placa aterosclerótica levando à trombose aguda. O termo aterosclerose (do Latim, *attinere*, significa parar, interromper) inclui a formação de placas ateromatosas e as complicações trombóticas associadas (Ruggeri, 2002). A plaqueta é um mediador essencial em vários tipos de resposta: endotelial, imune, inflamatória, trombótica e, portanto, tem papel-chave na iniciação da progressão da aterotrombose. Fortes evidências sustentam os benefícios dos agentes antiplaquetários como terapia da doença aterotrombótica (Baigent *et al.*, 2009).

A aterotrombose (Libby *et al.*, 2006) é constituída por dois processos: 1 – a aterosclerose um processo, inicialmente, reversível e, posteriormente, irreversível, responsável pelo estreitamento progressivo da luz do vaso arterial e, 2 – a trombose que interrompe o processo aterosclerótico de maneira súbita e irreversível (Hansson *et al.*, 2002).

Didaticamente, a aterotrombose pode ser dividida em cinco fases (Fuster & Lewis, 1944).

1. Disfunção endotelial: há o estímulo do depósito das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), acúmulo e oxidação dentro das células intimaais;

2. Resposta inflamatória: é o crescimento da placa via recrutamento endotelial de células inflamatórias; células musculares lisas migram até a lesão em que se replicam com o acúmulo de células espumosas carregadas de lipídios. Moléculas da matriz extracelular, como o colágeno e a elastina, colocam as células unidas juntas;
3. Formação da placa madura com superfície calcificada e capa fibrosa;
4. Ruptura da capa fibrosa: há o colapso das células musculares lisas maior que a sua proliferação com a consequente erosão ou ruptura da superfície, expondo, então, os componentes protrombóticos da placa e iniciando a resposta da coagulação;
5. Resposta trombótica aterosclerótica: há a formação de um trombo rico em plaquetas sobre a lesão erodida, com a consequente manifestação clínica, dependente do leito vascular envolvido. É importante enfatizar que a ruptura da placa é um processo contínuo, virtual e que, não necessariamente, resulta em processo clínico identificável isquêmico (Falk & Shah, 1995). Pode ocorrer, também, que a superfície de uma placa instável passe por repetidos ciclos de ruptura, trombose e “cura” antes de produzir sintomas clínicos. Portanto, a aterotrombose constitui um processo caracterizado por períodos de estabilidade e instabilidade. Esta variabilidade é denominada vulnerabilidade da placa (Becker *et al.*, 2009).

O estímulo das plaquetas libera o ácido araquidônico da membrana fosfolipídica plaquetária. O ácido araquidônico liberado, sob a ação da enzima ciclo-oxigenase (COX), é transformado numa prostaglandina instável e, biologicamente, ativa denominada tromboxane A₂. O tromboxane A₂ estimula a ativação das plaquetas e liberação de adenosina difosfato (ADP). O ADP, através dos receptores P₂Y₁₂, induz a agregação irreversível das plaquetas (Engler & Engler, 2006). O ácido acetilsalicílico acetila a serina da posição 529 da cadeia polipeptídica da COX-1, inibindo, de forma irreversível, os efeitos dessa enzima e a formação do tromboxane A₂. Ademais, o ácido acetilsalicílico tem efeitos anticoagulantes vasculares, anti-inflamatórios e pró-fibrinolíticos (Morotz, 1977; Vorchheimer &

Becker, 2006). Contudo, esses benefícios são atenuados em pacientes diabéticos (*Antitrombotic Trialists Collaboration*, 2002; Aijan *et al.*, 2008).

Vários estudos epidemiológicos identificam nítida relação entre os fatores de risco (tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus (Aijan *et al.*, 2008), dislipidemias, sedentarismo e doença aterosclerótica, confirmando tratar-se de uma afecção multifatorial que envolve mecanismos ambientais e genéticos. Por isso, a mudança no estilo de vida, nos hábitos alimentares e o uso de fármacos contribuíram para melhorar a prevenção primária e secundária da doença aterosclerótica. Pacientes em uso de ácido acetilsalicílico podem ser acometidos de eventos aterotrombóticos (Clarke *et al.*, 2006; Davi & Patrono, 2007) e, aproximadamente, 20% terão algum evento vascular recorrente em cinco anos (Adamns *et al.*, 2003). Por essa razão, é necessário identificar aqueles que, eventualmente, serão baixo respondedores ao tratamento. A baixa resposta ao ácido acetilsalicílico (Papathanasiou *et al.*, 2009; Petricevic *et al.*, 2013) tem sido documentada pela medida da agregação plaquetária *in vitro*. Para tal procedimento, foram disponibilizados aparelhos denominados agregômetros.

O aumento da posologia do ácido acetilsalicílico não implica a redução de pacientes baixo respondedores e os dados do *Antiplatelet Trialists Collaboration* (1994) mostraram que doses de 160-325 e 500-1000mg são igualmente efetivas a doses de 75-150 e 160-325 mg/dia. Além disso, esse estudo mostrou também que a maior limitação ao aumento da posologia está relacionada à ocorrência de sangramento e irritação gastrointestinal. Por isso, a adição de outros fármacos, como os ácidos graxos Ômega 3, pode potencializar os efeitos antiagregantes do ácido acetilsalicílico sem os inconvenientes efeitos colaterais das doses maiores (Arcadi *et al.*, 2014).

A Farmacogenética diante dos conhecimentos atuais pode colaborar efetivamente na identificação de pacientes respondedores e baixo respondedores ao ácido acetilsalicílico (Kalow, 2002). O sequenciamento de genes, a identificação de polimorfismos genéticos de base única (SNPs) alterações de apenas um nucleotídeo do DNA pode ser o responsável pela ocorrência de pacientes não respondedores ou baixo respondedores (Akay *et al.*, 2009).

1.1 Benefícios terapêuticos do ácido acetilsalicílico

A eficácia e a segurança do ácido acetilsalicílico (Fuster *et al.*, 1993; Goodman & Gilman, 1996) analisada em, aproximadamente, 70 estudos clínicos randomizados incluíram, aproximadamente, 115.000 pessoas. Os benefícios terapêuticos foram testados em vários segmentos: populações aparentemente normais com baixo, moderado ou alto risco para eventos cardiocirculatórios, e populações portadoras de doenças com ou sem antecedentes de infarto agudo do miocárdio (IAM) e/ou acidente vascular cerebral encefálico (AVE) (SALT Collaborative Group, 1991; Rosamond *et al.*, 2007; Sandercock *et al.*, 2008). Os ensaios clínicos foram de curta duração ou se estenderam por um período de até 10 anos.

1.2 Prevenção primária da aterosclerose

Em 2012, a metanálise dos estudos de prevenção primária da aterosclerose mostrou que o ácido acetilsalicílico reduziu em 10% o número total de eventos cardiovasculares devido a redução de IAM (De Wood *et al.*, 1971; Ridker *et al.*, 1997) não fatal (20%). A redução da mortalidade de todas as causas cardiovasculares e por neoplasias foi insignificante, 1% e 7%, respectivamente. Os sangramentos ocorreram em 30% dos indivíduos em uso do ácido acetilsalicílico. Nesse segmento da população, para prevenir um evento cardiovascular, precisamos tratar 120 indivíduos e, em cada 73 tratados, haverá um caso de sangramento. Esses “benefícios modestos” e o elevado risco de sangramentos não justificam o uso rotineiro do ácido acetilsalicílico na prevenção primária de doenças cardiovasculares; há necessidade de se identificar grupos populacionais que irão se beneficiar e estabelecer doses adequadas, visando à efetividade terapêutica e ao baixo risco de sangramento.

Segundo a última Diretriz (*U.S. Preventive Services Task Force*, 2002), homens com idades entre 45 e 59 anos e com risco de IAM > 4% em 10 anos, homens com idades entre 60 e 69 anos e com risco de IAM > 9% em 10 anos e homens com idades entre 70 e 79 anos e com risco de IAM > 12% em 10 anos são

candidatos ao uso de ácido acetilsalicílico, desde que não haja risco elevado de sangramento.

Mulheres com idades entre 45 e 59 anos e com risco de AVE $> 3\%$ em 10 anos, mulheres com idades entre 60 e 69 anos com risco de AVE $> 8\%$ e mulheres com idades entre 70 e 79 anos e com risco de AVE $> 11\%$ em 10 anos são candidatas ao uso de ácido acetilsalicílico, desde que não haja risco elevado de sangramento (SALT Collaborative Group, 1991; Rosamond *et al.*, 2007; Sandercock *et al.*, 2008). O ácido acetilsalicílico está contraindicado em homens com idades inferiores a 45 anos, na prevenção primária do IAM em mulheres com idades inferiores a 55 anos e na prevenção primária do AVE. Da mesma forma está contraindicado o uso de ácido acetilsalicílico em homens e mulheres com idades superiores a 80 anos (Hayden *et al.*, 2002; Segal *et al.*, 2003).

1.3 Prevenção secundária da doença aterosclerótica

A metanálise dos estudos de prevenção secundária mostrou que o uso do ácido acetilsalicílico reduziu em 22% o número de IAMs e de AVEs em pacientes com antecedentes de doença cardiovascular (Ridker *et al.*, 1991; 1997). Nesses estudos, foram incluídos pacientes de alto risco e a duração do seguimento clínico variou entre semanas e 10 anos. No estudo ISIS-2 (Baigent *et al.*, 1998), *Second International Study of Infart Survival*, foram incluídos pacientes de alto risco e com suspeita de IAM. A terapêutica com o ácido acetilsalicílico foi iniciada durante as primeiras 24 horas do início dos sintomas, na dose de 162,5 mg/dia, e o tratamento foi mantido durante 4 semanas. Nesse grupo, o ácido acetilsalicílico reduziu o risco de mortalidade (23%), de reinfarto não fatal (49%) e de AVE não fatal (46%). Não houve aumento de AVE hemorrágico ou sangramento gastrointestinal significativo. Durante as primeiras quatro semanas de tratamento, 40 em cada 1.000 pacientes tratados com o ácido acetilsalicílico preveniram a ocorrência de um evento vascular (RR=30%). Em protocolos semelhantes, o *International Stroke Trial* e o *Chinese Acute Stroke Trial* (Adamns Jr *et al.*, 2003), testaram os efeitos do ácido acetilsalicílico em pacientes portadores de AVE isquêmico. A dose utilizada do ácido

acetilsalicílico foi de 300mg/dia e 160mg/dia, respectivamente. A redução da mortalidade e de AVE não fatal foi de 9 pacientes a cada 1.000 pacientes tratados com o ácido acetilsalicílico.

2 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

2 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

2.1 Farmacocinética

O ácido acetilsalicílico é o protótipo dos derivados dos salicilatos (casca e folha do salgueiro (*Salix Alba*) utilizados na prática clínica (Baigent *et al.*, 2009). Sua absorção é rápida e completa após a administração oral. Apesar de parcialmente absorvida pelo estômago, em sua maior parte o ácido acetilsalicílico é absorvido nas microvilosidades proximais do intestino delgado. Atinge o pico plasmático após 30 ou 40 minutos e a inibição das plaquetas é evidente após 60 minutos da ingestão do medicamento. A biodisponibilidade varia de 40% a 50% das posologias existentes no mercado. Após a ingestão, os salicilatos são hidrolisados no trato gastrointestinal, fígado, sangue e, posteriormente, são metabolizados no fígado, originando vários metabólitos inativos. A meia-vida é de, aproximadamente, 5 horas e 30 minutos, sendo, rapidamente, hidrolisado a ácido salicílico. Dependendo das doses administradas, as concentrações plasmáticas máximas são atingidas entre 25 e 120 minutos após a sua ingestão oral. Após hidrólise pelas esterases da mucosa gastrointestinal e hepática, o ácido acetilsalicílico atinge a circulação sanguínea de forma inalterado. Na circulação sanguínea, aproximadamente, 80% a 90% dos salicilatos se ligam às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. O grau de ligação diminui à medida que a concentração plasmática de salicilato aumenta. O volume de distribuição das doses habituais de ácido acetilsalicílico em indivíduos normais é de, aproximadamente, 170 mL/Kg de peso corpóreo. A concentração plasmática decai rapidamente com uma vida média de 15 a 20 minutos. Apesar do elevado *clearance* do ácido acetilsalicílico, a inibição plaquetária persiste devido à inativação irreversível da enzima ciclo-oxigenase (COX-1) plaquetária, tanto das plaquetas circulantes como dos megacariócitos, antes que esses sejam liberados na circulação em forma de plaquetas (Demers *et al.*, 1980). A cinética da eliminação depende da dose ingerida e o metabolismo é limitado pela capacidade das enzimas hepáticas. Em doses terapêuticas habituais, a metabolização do ácido acetilsalicílico

é hepática e sua eliminação ocorre após 2 a 3 horas, 90% por excreção renal. A excreção total do ácido acetilsalicílico não aumenta proporcionalmente com a dose ingerida; doses elevadas propiciam aumento de excreção de ácido acetilsalicílico não metabolizado (Figura 1) (Bairent *et al.*, 2009).

Fonte: Goodman & Gilman, 1996

Figura 1 - Estrutura química do ácido acetilsalicílico.

2.2 Farmacodinâmica

O ácido acetilsalicílico pertence ao grupo dos fármacos anti-inflamatórios não esteroides com propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. Inativa permanentemente os efeitos da enzima ciclo-oxigenase (COX) da prostaglandina H-sintetase-1 e 2 (COX-1 e COX-2). Essas isoenzimas catalisam a biossíntese dos prostanoídes convertendo o ácido araquidônico em prostaglandina H₂ (PGH₂), precursor imediato das prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF₂α, PGI₂ e TXA₂ (Figura 2).

Fonte: Armaganijan & Timerman, 2013

Figura 2 - Esquema representativo dos mecanismos de ação do Ácido Acetilsalicílico no metabolismo do Ácido Araquidônico.

A COX-1 e 2 são homodímeros compostos por três unidades ou domínios independentes; domínio do fator de crescimento epidérmico, domínio dos fatores ligantes de membrana e domínio das enzimas. No domínio das enzimas, a localização da peroxidase catalítica é adjacente ao da enzima COX-1 e está próxima ao canal hidrofóbico. Em humanos, o ácido acetilsalicílico inativa a COX-1 e, consequentemente, bloqueia o canal hidrofóbico por acetilação da serina da posição 595 da cadeia polipeptídica COX-1 e a serina da posição 516 da cadeia polipeptídica da COX-2, prevenindo o acesso à enzima catalítica (Batlouni & Ramires, 1999). As características hidrofóbicas do canal da COX-1 estabilizam as cadeias laterais da serina, que, quando modificadas, se tornam resistentes à hidrólise. Pelo fato da função plaquetária ser dependente da COX-1, doses baixas de ácido acetilsalicílico modificam as características das plaquetas. Ao contrário, a inibição da COX-2 nos processos inflamatórios requer doses elevadas de ácido acetilsalicílico, ingeridas em curtos intervalos de tempo, com o intuito de superar a acetilação de células que, em estado oxidativo (inflamatório), contém níveis elevados de peróxido, ressintetizando, rapidamente, a produção da enzima. Em humanos, a prostaglandina PGH_2 , resultante do estímulo das plaquetas e das células endoteliais dos vasos sanguíneos, produz,

primariamente, o TXA_2 e a PGI_2 , respectivamente. O TXA_2 derivado da COX-1 é inibido com doses baixas de ácido acetilsalicílico. A PGI_2 derivada da COX-2 é menos sensível às doses baixas de ácido acetilsalicílico. A produção da PGI_2 mediada pela COX-1 ocorre de forma transitória ao estímulo de vários agonistas (por exemplo, bradicinina) e é inibida com baixas doses de ácido acetilsalicílico (Figura 3). A produção da PGI_2 , mediada pela COX-2, ocorre de forma transitória aos estímulos (por exemplo, estresse de cisalhamento vascular), e é inibida com doses altas de ácido acetilsalicílico. Não foi observada relação entre maior supressão de PGI_2 , e predisposição à trombose com elevadas doses de ácido acetilsalicílico, inclusive, várias evidências sugerem que a PGI_2 tenha efeitos trombo protetores. (Figura 3)

Fonte: Bonow *et al.*, 2010

Figura 3 - Esquema representativo da inibição da ciclo-oxigenase pelo ácido acetilsalicílico

2.3 Posologia do ácido acetilsalicílico

Os estudos que avaliaram os efeitos antitrombóticos do ácido acetilsalicílico utilizaram diferentes doses desse medicamento. Os resultados possibilitaram o reconhecimento de doses eficazes e com baixa toxicidade, efeitos terapêuticos do ácido acetilsalicílico não relacionados ao TXA₂ e a ocorrência da baixa resposta ao ácido acetilsalicílico. Nos estudos placebo controlados, o ácido acetilsalicílico, na dose de 75mg/dia, foi eficaz em reduzir o risco de infarto do miocárdio (IM) a mortalidade cardiovascular em pacientes com angina instável (*RISC Group*, 1990) ou estável (Juul-Moller *et al.*, 1992), a incidência de acidente vascular encefálico (AVE) e a morte cardiovascular em pacientes com isquemia cerebral transitória (ICT) (Croset *et al.*, 1990). Esses benefícios foram estendidos para a redução do risco de AVE em pacientes submetidos à endarterectomia de carótidas. Na dose de 50mg/dia, o ácido acetilsalicílico também foi eficaz na prevenção de AVE. No *European Stroke Prevention Study* (ESPS -2, 1997) o ácido acetilsalicílico, 25mg duas vezes ao dia, reduziu o risco combinado de AVE e morte vascular em pacientes com AVE ou ICT prévios. A revisão do *Antithrombotic Trialists Collaboration* (1994) mostrou que, nos pacientes com angina estável, o ácido acetilsalicílico, na dose de 75mg/dia, 325mg/dia, 650mg/dia e 1.300mg/dia, reduziu, de forma semelhante, a incidência de IAM e morte súbita (*RISC Group*, 1990). Nos pacientes portadores de doença coronária e submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, a incidência de oclusão do enxerto foi semelhante quando se utilizaram diferentes doses do ácido acetilsalicílico 100mg/dia, 325mg/dia, 975mg/dia e 1.200mg/dia (Goldman *et al.*, 1988; Turpie *et al.*, 1993). Nos pacientes acometidos de IAM, o ácido acetilsalicílico, na dose de 162,5mg/dia, reduziu a mortalidade e o reinfarto não fatal.

Quanto aos efeitos colaterais, várias evidências clínicas demonstraram que o ácido acetilsalicílico na dose 300mg/dia, causou menos efeitos gastrointestinais adversos quando comparada com 1200mg/dia e a dose de 30mg/dia causou menos efeitos colaterais quando comparada com dose de 300mg/dia.

2.4 Efeitos do ácido acetilsalicílico: dose-dependentes

Alguns efeitos inibitórios do ácido acetilsalicílico na hemostase sanguínea são dose-dependentes (Ratnatunga *et al.*, 1992): podem alterar a fibrinólise (Bjornsson *et al.*, 1988) e suprimir parcialmente a coagulação sanguínea; dose única de ácido acetilsalicílico 500mg/dia inibe a geração de trombina, e doses múltiplas 300mg/dia reduzem a quantidade total da trombina gerada e circulante (Loew & Vinazzer, 1976). Dose inicial de 500mg/dia e doses múltiplas de 1500mg/dia suprimem a coagulação sanguínea por efeito antivitamina K. Os efeitos induzidos por doses elevadas do ácido acetilsalicílico são secundários à acetilação direta de um ou mais fatores inclusive do trombo plaquetário. Nessas circunstâncias, a participação da COX-1 é mínima e as doses de ácido acetilsalicílico são superiores às necessárias para a inibição do tromboxane TXA2.

2.4.1 Efeitos adversos

A prevenção de trombose e o risco de efeitos adversos sugere que apenas pacientes selecionados devam ser submetidos à terapêutica com o ácido acetilsalicílico. Nas populações de baixo risco, risco de evento cardiovascular $\leq 1\%$ ao ano, o ácido acetilsalicílico não trouxe benefícios e o risco de efeitos adversos não justifica seu uso na prevenção da aterotrombose. Nas populações de alto risco, risco de evento cardiovascular $> 3\%$ ao ano, o ácido acetilsalicílico trouxe benefícios e o risco de efeitos adversos justifica seu uso na prevenção da aterotrombose. Nos pacientes com IAM ou em prevenção secundária, os benefícios superam os riscos de sangramento (1/1.000 pacientes tratados/ano), justificando plenamente o uso do ácido acetilsalicílico (Food and Drug Administration, 2002; Watala *et al.*, 2004; Zimmermann & Hohlfeld, 2008; Postula *et al.*, 2010).

2.5 Baixa resposta ao ácido acetilsalicílico

Em 25% dos pacientes portadores de doenças cerebrovasculares, o ácido acetilsalicílico inibe a agregação plaquetária desde o início do tratamento e, aproximadamente, 30% dos pacientes desenvolvem baixa resposta durante tratamento prolongado independentemente das doses de manutenção (Latini *et al.*, 2000). Nos portadores de coronariopatia (Gum *et al.*, 2003) ou doença vascular periférica, os benefícios do ácido acetilsalicílico foram variáveis. Nos pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, o ácido acetilsalicílico foi eficaz em reduzir outros eventos cardiovasculares subsequentes em 40% dos pacientes tratados. No *Research Group on Instability in Coronary Artery Disease in Southeast Sweden Study* (Wallentin, 1991) o ácido acetilsalicílico foi eficaz em 35% dos pacientes.

A variabilidade desses resultados pode estar relacionada ao método de mensuração da agregação plaquetária. Mensurações simultâneas por meio de vários métodos laboratoriais (Cattaneo, 2007), no mesmo paciente, mostraram que 57% dos portadores de insuficiência cardíaca eram não responsivos ao ácido acetilsalicílico na dose de 325mg/dia, durante 30 dias. Na maioria dos estudos, há vieses relacionados a não aderência dos pacientes à prescrição médica, à mensuração realizada por um único teste laboratorial, à variabilidade intra e extraindividual, à mensuração por métodos não reportados, à falta de critérios que definem o normal e o baixo respondedor, ao uso de doses múltiplas de ácido acetilsalicílico, ao tamanho da amostra e a não inclusão do grupo de controle, dificultando a interpretação dos resultados.

**3 Ácidos Graxos Poli-insaturados da
Família Ômega 3 (AGw - 3)**

3 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA 3 (AGw - 3)

O óleo de peixe contém quantidades apreciáveis de uma série incomum de ácidos graxos poli-insaturados, conhecida como ômega 3, assim denominado n-3, no qual a primeira dupla ligação se localiza no terceiro átomo de carbono a partir da extremidade metil. Já em 1944 (Sinclair, 1944), observou-se a raridade da cardiopatia isquêmica e de outras evidências da aterosclerose nos esquimós da Groenlândia (Simopoulos, 1999). Tal fato estaria associado à dieta peculiar dos esquimós nativos representada pelos peixes e animais marinhos (focas, morsas, baleias). Além disso, nessa população, as escoriações eram comprometidas com maior índice de sangramento.

Os ácidos graxos ômega 3 (Figura 4) predominantes nos peixes marinhos, especialmente de água fria – salmão, cavala, atum, albacora, bacalhau, arenque, anchova, malibu, haddock – pertencem à família do ácido alfa-linolênico ou ômega 3. Seus principais representantes são o eicosapentaenoico (EPA) e o docosa-hexaenoico (DHA), originados do *fitoplankton* consumido por esses peixes. As variações sazonais do *fitoplankton* refletem no conteúdo do ácido graxo ômega 3 desses peixes (Simopoulos, 1999; Ele *et al.*, 2004).

Quando os ácidos graxos ômega 3 são incluídos na dieta, o EPA e o DHA competem com o ácido araquidônico em diversas vias locais, inibindo a síntese do ácido araquidônico a partir do ácido linoleico, competindo com o ácido araquidônico pela posição 2-acil nas membranas fosfolipídicas (Eikelboom *et al.*, 2002) e reduzindo, conseqüentemente, os níveis celulares de ácido araquidônico. O EPA compete com o ácido araquidônico como substrato para a enzima ciclo-oxigenase, inibindo a produção de tromboxane A₂ pelas plaquetas. Nas células endoteliais, a produção de PGI₂ é fracamente inibida e ocorre produção de PGI₃ a partir do EPA, cuja atividade fisiológica se soma à da PGI₂ (US Preventive Services Task Force, 2002). O resultado final é o desvio favorável do balanço hemostático para uma condição mais vasodilatadora e menos agregante plaquetária (Pearson *et al.*, 2002). Concluindo, inibindo a síntese de ácido araquidônico ou competindo pela sua

posição 2-acil nas membranas fosfolipídicas, não há substrato para a ação da enzima ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e não há, então, sua conversão, nas plaquetas para o tromboxane A₂, potente vasoconstritor e agregante plaquetário, e, nos vasos sanguíneos (células endoteliais), para a prostaglandina ou prostaciclina (PGI₂) potente vasodilatador e inibidor plaquetário (Freemantle *et al.*, 1999).

A dieta ocidental típica é rica em ácidos graxos ômega-6 provenientes da ingestão de óleo de soja, milho, girassol e cártamo (planta bulbosa semelhante ao açafrão). Nessa dieta, a concentração de ingestão entre o ácido ômega 6 e ômega 3 é de 10 a 20:1. Essa relação não é ideal e têm sido propostas dietas cuja relação entre os dois grupos de ácidos graxos seja de 1-1:1 visando a efeitos vasodiladores, anti-inflamatórios e antitrombóticos (Harris, 2007).

O ácido docosahexaenoico, produto em maior quantidade nos ácidos graxos ômega 3, tem presença marcante nos fosfolípides das células da retina e do cérebro, exercendo, também, importante papel na prevenção do risco cardiovascular (Salem Jr *et al.*, 2001).

Figura 4 - Estrutura química dos ácidos graxos ômega 3

Os ácidos graxos ômega 3 são o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o docosahexaenoico (DHA) e são ácidos carboxílicos; polinsaturados em que a dupla ligação está no carbono 3 (n-3) a partir da extremidade oposta ao grupo carboxila (COOH). Os que beneficiam a saúde são os de cadeia longa e não são sintetizados pelo organismo (Goodman & Gilman, 1996).

O envelhecimento é um fator de risco cardiovascular (Vericel *et al.*, 1992) e, nessa população, as plaquetas respondem intensamente aos agentes agregantes. Nos idosos, a peroxidação celular é mais intensa e os níveis de malondialdeído (marcador global da peroxidação) estão mais elevados (Grove, 2012). Por isso, é incentivador a proposta em reduzir a peroxidação celular, (*peroxide tone of the cell*) nessa população (Hecker *et al.*, 1991) por meio da ingestão de ácidos graxos ômega 3, na dose de até 1000mg/dia.

A posologia de DHA é variável: 400mg/dia a 800mg/dia de DHA modificam as funções celulares e a agregação plaquetária colágeno-induzida (Croset *et al.*, 1990). Por isso, baixas dosagens de DHA (1000mg) podem ser efetivas na redução da agregação plaquetária e da antioxição. Contudo, esses resultados podem ser mascarados quando há uma ingestão elevada de ácidos graxos ômega 3. Nessas circunstâncias, o DHA pode ter apenas efeitos complementares do EPA na redução da peroxidação lipídica. O EPA compete com o ácido araquidônico no nível da ciclo-oxigenase e é convertido em prostanoídes de diferentes atividades biológicas, enquanto que o DHA não é um precursor prostanoide, mas um potente inibidor da ciclo-oxigenase-1. Além disso, o EPA é um bom substrato para as lipo-oxigenases e os produtos finais de sua metabolização são eficientes inibidores da agregação plaquetária tromboxano-induzida. Dentre esses, destacam-se as poxitrinas, inibidoras da ciclo-oxigenase-1 e resultantes da degradação final das lipo-oxigenases plaquetárias. Ademais, a ingestão de DHA permite à membrana fosfolipídica plaquetária lentificar e reduzir a agregação plaquetária (Figura 5).

Figura 5 - Esquema representativo da produção das poxitrinas a partir do ácido docosa-hexaenoico (Chen *et al.*, 2011)

As poxitrinas são triênios conjugados (E/Z/E) do ácido docosa-hexaenoico e inibem a agregação plaquetária via colágeno, via ácido araquidônico (tromboxane), via inibição da ciclo-oxigenase (específica) e via U46619 (agonista do receptor tromboxane) (Chen *et al.*, 2011).

4 MONITORAMENTO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

4 MONITORAMENTO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Constitui um pensamento pertinente à adequação para cada indivíduo da terapêutica antiplaquetária (antiagregante) baseada em testes que medem a função plaquetária. Os estudos em andamento desafiam a proposta de uso corrente de dose única para todos os pacientes (*“One-size-fits-all dosing strategy”*).

Os dados da literatura mostram que vários métodos foram utilizados para medir a função plaquetária (Jámber *et al.*, 2009). O monitoramento dos níveis séricos de tromboxane B2, metabólito ativo do tromboxane A2, pode constituir um dos métodos para a avaliação dos efeitos inibitórios do ácido acetilsalicílico. Trata-se de um metabólito estável de tromboxane B2, excretado na urina. Todavia, esse metabólito pode ser gerado pelas vias COX-1 e COX-2, não refletindo a inibição plaquetária *per se* e sim um panorama geral do *status* pós-inflamatório (Figura 6).

Nature Reviews | Drug Discovery

Fonte: Michelson, 2010

Figura 6 - Vias de agregação plaquetária

O agregômetro *Multiplate* (agregometria por eletrodo múltiplo – Dynabyte, Munich, Germany) é um dispositivo que utiliza a impedância elétrica entre dois eletrodos imersos em sangue preparado com hirudina. A hirudina é um anticoagulante que não interfere com o mediador cálcio. A adição de reagente ASPItest (ácido araquidônico) estimula a ativação e a agregação plaquetária (Buchanan & Brister). As mudanças na impedância elétrica são plotadas em uma curva expressa pelo tempo formando um gráfico. A eficácia da inibição plaquetária é expressa pela área sob a curva de agregação (AUC) obtida durante os 6 minutos de medição. O acoplamento das plaquetas aos sensores (eletrodos) modifica a resistência deste dispositivo e tem relação direta com a agregação das plaquetas. A análise numérica é representada pela medida da área sob a curva que o visor do *Multiplate* expõe. Este método tem vantagens: é semiautomático, padronizado, avalia a eficácia da inibição plaquetária no sangue (*in vitro*), tem baixa possibilidade da ocorrência de artefatos e prediz eventos de sangramentos e trombóticos. Dentre as desvantagens: é parcialmente automático, necessita preparo da amostra e pipetagem eletrônica (Anexo A).

Nesse estudo, todos os pacientes farão teste com o ácido acetilsalicílico 100mg/200mg e associação do ácido acetilsalicílico com ácido graxo ômega 3. Em cada fase do experimento, as curvas serão calculadas e, pelo coeficiente de Pearson, serão calculadas as diferenças entre as áreas sob as curvas. Os valores permitirão classificar os resultados em tercís. No primeiro tercís, estarão incluídos os pacientes respondedores, no segundo e no terceiro tercís, estarão incluídos os pacientes pouco respondedores ou não respondedores, respectivamente.

Utilizamos para avaliar a função plaquetária a plataforma *Multiplate* por ser esta disponível no Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Os valores de corte para o ASPItest foram (Surin *et al.*, 2008; Bonow *et al.*, 2010):

Pacientes que usam AAS:

- 1- Muito bom respondedor: < 30 U (AUC)
- 2- Bom respondedor: < 40 U (AUC)

3- Acima 40 U não respondedor, entretanto, existem outros tipos de agregômetro:

- LTA: funciona por transmissão de luz, é considerado padrão-ouro historicamente. Como desvantagem, requer consumo de tempo, o preparo das amostras é complicado e requer pessoal de laboratório treinado. Os agonistas da agregação plaquetária, como o difosfato de adenosina (ADP) e ácido araquidônico (ASPI), quando utilizados, causam adesão e agregação plaquetária causando decréscimo ótico da luz. (Turbidimetria) (Freire *et al.*, 2007).
- *VerifyNow*: membrana de poliestireno recoberta por fibrinogênio que auxilia a agregação plaquetária. Agonistas, ADP mais PGE1 (P2Y12), ácido araquidônico (AAS) e TRAP-6 (IIb/IIIa assay). Vantagens: usa sangue total, é simples e rápido, e é um procedimento padronizado. Desvantagens: representa um custo alto dos cartões para realização do exame.
- PFA-100: Método: medida da abertura de uma membrana revestida por colágeno. Agonistas: ADP + colágeno + cisalhamento, adrenalina + colágeno + cisalhamento. Vantagens: usa sangue total, é simples e rápido, e é um procedimento padronizado. Desvantagens: depende do hematócrito e do FvW, e conta com poucos estudos científicos realizados.

**5 POLISMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS COM A BAIXA
RESPOSTA AO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO "EX VIVO"**

5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS COM A BAIXA RESPOSTA AO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO "EX VIVO"

O reconhecimento dos diversos mecanismos de ativação plaquetária sinalizam múltiplas oportunidades para sua inibição, tendo como alvos receptores e enzimas específicas. Nas últimas décadas, tem aumentado o número de fármacos efetivos na inibição da formação do trombo e na redução do processo inflamatório, estabilizando a ruptura da placa aterosclerótica. Na prática clínica, estão disponíveis fármacos com seletividade para a inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), dos receptores P2Y₁₂, da adenosina difosfato (ADP), da GPIIb/IIIa, e dos receptores de trombina e tromboxane A₂.

O ácido acetilsalicílico em baixas dosagens foi o primeiro fármaco a ser utilizado com relativa segurança e comprovado efeito antiagregante e anti-inflamatório. Seus efeitos farmacológicos inativam irreversivelmente a enzima COX-1 e COX-2, bloqueando a produção de tromboxane A₂ gerado pela cascata do ácido araquidônico.

O uso do ácido acetilsalicílico tem se mostrado efetivo nos processos inflamatórios COX-1 dependentes e na agregação plaquetária. Todavia, sua eficácia não foi observada nos indivíduos portadores de alguns polimorfismos específicos da COX-1, GP IIIa (β 3-integrina) e GP IaIIa.

A agregação plaquetária e os efeitos farmacológicos de alguns medicamentos foram avaliados em vários ensaios farmacogenéticos. Esses ensaios não incluíram apenas o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs) dos genes codificados nos receptores das enzimas GPIIb/IIIa, GPIa/IIa, GPIb/IX/V e CYP.

Pelo fato de vários receptores das glicoproteínas serem polimórficos (Weiss *et al.*, 1996), vários SNPs podem afetar sua estrutura e estar associados à ocorrência de eventos cardiocirculatórios. Os mais estudados foram o *Human Platelet Antigen I* (HPA-I), o polimorfismo que afeta a GPIIIa, o antígeno plaqueta específico (PIA) codificado na GPIIIa e que contém dois antígenos, A1 e A2, localizados no fragmento 17 a 23.

A substituição de uma sequência de base 1565 no gene $\beta 3$ resulta nos polimorfismos da HPA-1, também denominados polimorfismo da PIA 1/A2 (Wiwanitkit, 2006). Esses polimorfismos têm sido, frequentemente, associados ao aumento do risco de aterotrombose, todavia, essa relação não têm sido consistente em todos os ensaios clínicos (Weiss *et al.*, 1996; Ridker *et al.*; Salamani & Lodnick, 1997; Gardemann, 1998; Kastrati *et al.*, 2000; Wiwanitkit, 2006; Le Hello *et al.*, 2007). Em alguns ensaios, o alelo PIA2, particularmente nos homozigotos, tem sido associado à trombose coronária e seu polimorfismo pode atenuar os efeitos inibitórios do ácido acetilsalicílico, do clopidogrel e do abciximab. Outros estudos que avaliaram a baixa resposta ao ácido acetilsalicílico incluíram os genótipos com polimorfismos do PIA 1/ A2 ou PIA 2/ A2. Nesses estudos, os efeitos do polimorfismo do PIA 2/A2 não foram semelhantes quando da inclusão de pessoas saudáveis e pessoas portadoras de DAC. Avaliou-se, também, o polimorfismo de outras HPA da GPIIb/IIIa e os resultados da sua associação com DAC foram conflitantes (Cambria-Kiely & Gandhi, 2002; Le Hello *et al.*; Papp *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2008).

A GPIa/IIa ($\alpha 2\beta$ integrina), receptor plaquetário de colágeno, facilita a ligação da plaqueta ao colágeno fibrilar tipo I e II do subendotélio e a formação do trombo em condições de baixo estresse de cisalhamento (Macchi *et al.*, 2003). A ativação dos receptores dessas glicoproteínas inicia a cascata do ácido araquidônico e da liberação do tromboxane. Acredita-se que o aumento dos receptores dessas glicoproteínas aumenta o risco de infarto do miocárdio e de outros eventos trombóticos (Surin *et al.*, 2008). A exposição variável do receptor de colágeno plaquetário da GPIa/IIa, primariamente, ocorre pela presença dos SNPs na subunidade do gene da GPIa ($\alpha 2$). O polimorfismo 807C>T da subunidade GPIa mantém uma ligação em cadeia desequilibrada (LD) com outros SNPs dessa subunidade. Três diferentes genótipos do 807C>T têm sido associados às diferentes expressões da GPIa/IIa; TT, TC e CC. A presença do alelo TT dobrou a incidência de infarto agudo do miocárdio quando comparado com os alelos TC e CC.

O complexo GPIb/IX/V é o receptor da membrana plaquetária ao Fator de VonWillebrand (VWF). Trata-se de um mediador da adesão plaquetária em condições de elevado estresse de cisalhamento, ativando a agregação e a

desgranulação das plaquetas. Alterações na estrutura intra e extracelular do GPIb podem afetar a ativação e a ligação das plaquetas ao FvW. Frequentemente, três polimorfismos genéticos são relatados na estrutura da GPIb: 1) repetidas tendências no números de variáveis (VNTR), 2) transição do nucleotídeo 1018C>T ou dimorfismo do aminoácido Thr145Met da GPIb (α), afetando a afinidade de ligação das plaquetas e, 3) polimorfismo -5T>c, sequência Kozak da GPIb (α), afetando da densidade da GPIb/IX/V na superfície plaquetária. O estudo chinês que incluiu pacientes com complicações cerebrovasculares, o genótipo homozigoto VNTR-CC foi protetor em pacientes não responsivos ao ácido acetilsalicílico. Todavia, a relevância desse polimorfismo, do gene GPIb, e sua associação com eventos cardiocirculatórios, permanece incerta (Bonow *et al.*, 2010).

Os estudos que avaliaram a baixa resposta terapêutica ao ácido acetilsalicílico e sua relação com o polimorfismo genético de um único nucleotídeo (SNP) dos genes de receptores plaquetários incluíram: pequenas amostras populacionais, variabilidade de polimorfismos genéticos pesquisados, e diversidade nos métodos de avaliação bioquímica e funcional das plaquetas, *ex vivo*. Consequentemente, trouxeram resultados conflitantes.

A metanálise publicada em 2007, após revisão sistemática de estudos caso controle, incluiu populações saudáveis e indivíduos portadores de doenças cardiocirculatórias, submetidos à mensuração da agregação plaquetária por meio de agregômetros padronizados. Nesses estudos, foram identificados 50 polimorfismos em onze genes e apenas cinco (GPIIIa, GPIa, COX-1, P2Y12 e P2Y1) foram passíveis de análise estatística adequada. Em 1389 indivíduos incluídos em 19 estudos, avaliou-se o SNP PIAI/A2 do gene do receptor GPIIIa da superfície plaquetária. Todavia, apenas 10 estudos, quatro que incluíram indivíduos saudáveis e seis que incluíram indivíduos portadores de doenças cardiovasculares, permitiram uma adequada análise estatística. O alelo PIA2 nos indivíduos saudáveis aumentou significativamente a baixa resposta ao ácido acetilsalicílico ($p=0,009$), fato não observado nos portadores de doenças cardiovasculares ($p=0,64$). Dentre os agregômetros, o PFA-100 foi utilizado em 5 estudos, o LTA em 3 estudos e o tempo de sangramento ou a geração da trombina em apenas 1 estudo. O alelo PIA2, pelo agregômetro LTA, se relacionou fortemente com a baixa resposta ao ácido

acetilsalicílico, entretanto, pelo agregômetro da PFA-100, houve apenas uma relação tênue com a baixa resposta ao ácido acetilsalicílico. Pela mensuração do tempo de sangramento ou da geração de trombina, o polimorfismo no alelo PIA2 aumentou em 11,7 vezes a baixa resposta ao ácido acetilsalicílico. Não houve relação, estatisticamente significativa, entre os polimorfismos de genes dos receptores GPIa, COX-1, P2Y12 e baixa resposta ao ácido acetilsalicílico.

O estudo *Aspirin Resistance: Clinical Significance and Genetic Polymorphism* (Bjornsson *et al.*, 1988) avaliou a prevalência e as implicações clínicas da resistência ao ácido acetilsalicílico em pacientes chineses idosos. A agregação plaquetária foi mensurada pelo agregômetro LTA, após uso de 4 indutores extrínsecos. Os participantes foram divididos em baixa resistentes ao ácido acetilsalicílico (RA), semirresistentes ao ácido acetilsalicílico (SRA) e sensíveis ao ácido acetilsalicílico (SA), de acordo com os resultados da agregação plaquetária *ex vivo*. A baixa resposta ao ácido acetilsalicílico também foi testada pelo tromboelastograma (TEG), após indução com o ácido araquidônico e com o difosfato de adenosina. A dosagem sérica e urinária do TXB2, a análise da função plaquetária e a dosagem sérica da P-seletina foram realizadas em todos os participantes do estudo. Foram avaliados os polimorfismos dos alelos A842G, CJOT, C22T, GI28A, CG44A e C7114A do gene da prostaglandina endoperoxídeo sintetase-1 (PTGS1), o polimorfismo do alelo G765C do gene da prostaglandina endoperoxídeo sintetase-2 (PTGS2) e o polimorfismo do alelo ITGB3 do gene da integrina β (ITG β 3). O estudo incluiu 360 indivíduos em uso de ácido acetilsalicílico em 314 indivíduos saudáveis e sem uso de ácido acetilsalicílico. Nos SA, os níveis séricos de TXB2 foram inferiores aos dos RA e SRA. Os níveis séricos de P-seletina foram significativamente mais baixos nos RA. O tromboelastograma, após indução com ácido araquidônico, foi mais sensível do que os níveis séricos de P-seletina. A frequência da mutação do alelo G765C da PTGS2 foi significativamente maior nos indivíduos RA e SRA.

Nos portadores de DAC, as comorbidades participam efetivamente na agregação plaquetária e determinadas variáveis genéticas podem tornar-se irrelevantes. No *Women's Genome Health Study* (Debette *et al.*, 2015), as variáveis genômicas não foram associadas com a ocorrência de futuros eventos, inclusive após ajuste dos fatores de risco. O estudo *ARIC* (Lee *et al.*, 2008; Shiffman *et al.*, 2009)

avaliou, primariamente, a relação entre o polimorfismo dos genes PTGS1 e PTGS2 com maior incidência de eventos isquêmicos cerebrais e coronários. Secundariamente, avaliou a relação da presença desse polimorfismo e os possíveis benefícios do ácido acetilsalicílico. Nesse estudo, os pacientes acometidos por DAC e/ou AVE eram significativamente mais idosos, do sexo masculino, fumantes, diabéticos, hipertensos e com alterações do perfil lipídico quando comparados com aqueles que não tiveram evento cardiovascular isquêmico. No subgrupo sem o uso do ácido acetilsalicílico, a incidência de AVE foi maior nos afro-americanos quando comparados com os caucasianos. Nos caucasianos, o polimorfismo do gene PTGS1 foi significativamente associado ao AVE isquêmico quando comparado com os caucasianos do grupo-controle, 18,2% e 10,6%, respectivamente ($P=0,027$). Nos afro-americanos, o polimorfismo do gene PTGS2 foi significativamente associado ao AVE isquêmico, quando comparado com os afro-americanos do grupo-controle, 61,4% e 49,4%, respectivamente ($P=0,032$). Os autores concluíram que, nos caucasianos, o ácido acetilsalicílico modulou a relação entre polimorfismo PTGS2 e o risco eventos coronários, interação $P=0,072$ e $q=0,137$. No estudo ARIC as variantes de alelo em PTGS1 (-100 6 A) e do alelo em PTGS2 (-765C) foram associadas ao maior risco de AVE, tanto nos caucasianos como nos afro-americanos. O alelo em PTGS1 (G2305) também parece estar associado ao maior risco de AVE e DAC, tanto nos afro-americanos como nos caucasianos.

5.1 Implicações genéticas do polimorfismo

Para a compreensão dos diferentes mecanismos de ativação da agregação plaquetária, vários caminhos foram sinalizados tendo como alvos receptores e enzimas celulares. Esses conhecimentos enriqueceram o tratamento com a introdução de novos antiplaquetários, permitindo tratamentos efetivos e seguros na inibição da formação e do grau de inflamação, estabilizando o trombo e a ruptura de placas ateroscleróticas. Atualmente, estão disponíveis vários fármacos inibidores da enzima ciclo-oxigenase (COX), dos receptores P2Y₁₂ do ADP (clopidogrel), da glicoproteína GPIIb/IIIa (abciximab, eptifibatide e tirofiban), da trombina (hirudina,

argatrobana, ximelagatrana, dabigatrana, bivalirudina) fondaparinux – Fator Xa, e dos receptores do tromboxane A₂ (sulotroban, ridogrel). O ácido acetilsalicílico em baixas dosagens foi o primeiro antiplaquetário que se mostrou eficaz, com perfil relativamente seguro, como mediador irreversível da inativação da COX-1 e bloqueio da geração do tromboxane A₂ pela cascata do ácido araquidônico. Todavia, também foi demonstrado que a maioria das doenças associadas ao baixo grau de inflamação relaciona-se com a ativação das plaquetas COX-1 dependentes. Consequentemente, polimorfismos genéticos que afetam a COX-1, GP IIIa (β 3-integrina) e GPIa, GPIb, também afetam os inibidores da COX-1 dependentes

6 HIPÓTESE

Esse estudo foi desenhado para testar a hipótese de que a administração de 200mg/dia de ácido acetilsalicílico ou 100mg/dia de ácido acetilsalicílico associado à 1g de ácido graxo ômega 3 pode reduzir o número de pacientes não respondedores à dose de 100mg/dia de ácido acetilsalicílico, em pacientes com doença arterial coronária crônica.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo primário

Avaliação farmacogenética do ácido acetilsalicílico em pacientes com doença arterial coronária crônica.

7.2 Objetivos secundários

1. Avaliar os polimorfismos genéticos e sua relação com os respondedores e não respondedores ao uso do ácido acetilsalicílico;
2. Avaliar a agregação plaquetária, *in vitro*, nos pacientes submetidos à terapêutica com o ácido acetilsalicílico nas doses de 100mg/dia mais 1g de ácido graxo ômega 3 e na dose de 100mg do ácido acetilsalicílico duas vezes ao dia;

8 JUSTIFICATIVA

Os efeitos do ácido acetilsalicílico em inibir a agregação plaquetária constituem a principal indicação de seu uso na prevenção primária e secundária de eventos aterotrombóticos. Além dos efeitos antiagregantes, reduz os níveis séricos da proteína C ultra sensível (PCR) e seus benefícios incluem ação anti-inflamatória. A ocorrência de não respondedores ao uso de ácido acetilsalicílico implica na existência de vários fatores, dentre os quais se destacam os polimorfismos genéticos. A dose preconizada do ácido acetilsalicílico 100mg/dia pode inibir de forma insuficiente a agregação plaquetária. Ajustes de doses até 200mg/dia podem reduzir o número de não respondedores e estar relacionada à presença de diferentes fatores de risco para doença aterosclerótica. Além disso, doses preconizadas de ácido acetilsalicílico, 100mg/dia, associadas ao ácido graxo ômega 3, na dose de 1000mg/dia, podem reduzir o número de não respondedores ao tratamento clássico, evitando os efeitos indesejáveis, tais como o sangramento e as alterações gastrointestinais, relacionados ao uso de ácido acetilsalicílico em doses elevadas.

9 CASUÍSTICA

9.1 Delineamento do estudo e população

Trata-se de estudo analítico experimental prospectivo, no qual os participantes de pesquisa foram triados e avaliados no Ambulatório do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no período de maio de 2013 a outubro de 2015. No total, foram selecionados 175 pacientes de todas as faixas etárias de ambos os sexos, não aparentados, de qualquer etnia, com doença arterial coronária crônica e em uso de ácido acetilsalicílico (AAS). A randomização foi feita por pareamento.

9.1.1 Critérios de inclusão

- Portadores de doença arterial coronária crônica em uso de ácido acetilsalicílico 100 mg/dia, antes de sua inclusão;
- Sem uso prévio de medicamentos que possam interferir na ação do ácido acetilsalicílico;
- Após assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

9.1.2 Critérios de exclusão

- Intolerância ao uso do ácido acetilsalicílico;
- Insuficiência renal (*Clearance* de creatinina menor que 30ml/minuto calculado pela fórmula de *Cockcroft-Gault* 140 menos a idade em anos multiplicado pelo Peso em quilos, dividido pela Creatinina plasmática multiplicada por 72 ou dosado em exame de urina de 24 horas);
- Insuficiência hepática;

- Antecedentes de úlcera gástrica ou sangramento gastrointestinal;
- Hipertensão arterial sistêmica não compensada;
- Gestação;
- Neoplasias;
- Cirurgias de grande porte;
- Uso prévio (6 meses a 1 ano) de: clopidogrel, warfarina e heparina subcutânea, dentre outros;
- Hematúria;
- Eosinofilia; - eosinofilia (síndrome *Dress*: hipersensibilidade a droga);
- Leucopenia (Artrite Reumatoide: AAS ↑ metotrexate plasmático – mielotoxicidade);
- Depressão medular (Leucopenia);
- Alergia a peixes de água fria;
- Asma brônquica.

9.1.3 Critérios de interrupção do estudo

Indivíduos que não desejassem mais participar do estudo, indivíduos não aderentes à medicação, distância geográfica com relação ao local da pesquisa e falecimento.

10 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos propostos estão de acordo com recomendações e diretrizes das principais sociedades específicas da área do Brasil, tendo sido o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no dia 01 de outubro de 2013 CAAE:22534113.0.0000.5462, Número do Protocolo no CEP: 4369 (Anexo B). Todos os pacientes que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo C). O material biológico (amostras de soro e amostras de ácidos nucleicos) foi armazenado no Laboratório de Biologia Molecular para estudos futuros, após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa, e com autorização do participante da pesquisa.

Suporte financeiro para a realização das análises genéticas e de agregação plaquetária foi proveniente da Fundação Adib Jatene (FAJ) no dia 03 de abril de 2014 (conta 07008 – Divisão Clínica, conforme consta de fls.05).

11 MÉTODOS

11.1 Avaliação clínica e segmento

Na visita 1 (**tempo A**) após a explicação detalhada e obtenção da assinatura do TCLE, os pacientes foram submetidos à primeira avaliação clínico/laboratorial. Durante essa consulta, foi realizada anamnese, exame clínico e a avaliação dos critérios de inclusão e exclusão. Todos os pacientes deveriam estar fazendo uso de AAS 100mg/dia (forma convencional) por um período superior a 30 dias.

Nos elegíveis a coleta dos exames de laboratório foi realizada após jejum de 10 a 12 horas e 24 horas após a ingestão de 100mg de AAS (ambatório de farmacogenômica). Os pacientes tiveram então, sua posologia ajustada para AAS 200mg/dia (**Grupo AAS200**) ou 100mg/dia associada ao ácido graxo ômega 3 na dose de 1g/dia (**Grupo O3**) por 30 dias, e foram orientados a manter o uso do medicamento até a véspera da visita 2 (**Tempo B**), sendo que o último comprimido de AAS ou da associação AAS com ácido graxo ômega 3 deveria ser ingerido 24 horas antes da visita 2 na qual os pacientes foram submetidos à nova avaliação clínico/laboratorial.

Na coleta de sangue para as dosagens bioquímicas e de biologia molecular para cada paciente foram utilizados quatro tubos secos, quatro tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), dois tubos contendo citrato, um tubo contendo fluoreto e um tubo contendo hirudina para a análise de agregação plaquetária na plataforma Multiplate® (Roche, Basileia, Suíça). Foi coletado também um frasco contendo a primeira urina da manhã ou de retenção mínima de 4 horas, para exames de Urina I (Anexos D, E, F e G).

11.1.1 Amostras biológicas e determinações laboratoriais

Foram realizadas as seguintes determinações laboratoriais: glicemia, colesterol total e frações (*high-density lipoprotein* – HDL, *low-density lipoprotein* – LDL e *very low-density lipoprotein* – VLDL), triacilglicerol, hemograma completo, ureia sérica, creatinina sérica, ácido úrico sérico, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), produtos de degradação da fibrina (D Dimer), proteína C reativa ultrasensível (PCRus) e Urina I.

Os exames laboratoriais foram realizados por métodos enzimático-colorimétricos e imunoquímicos no Laboratório Clínico do Instituto Dante Pazzanese em colaboração com a Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa, para o acompanhamento dos pacientes em vigência dos fármacos do estudo.

11.2 Análise da função plaquetária

Durante as visitas 1 e 2, a função plaquetária dos pacientes em uso de AAS100, AAS200 e AAS100+O3, foi determinada por meio da análise *in vitro* utilizando a plataforma *MultiplateTM analyzer* (Roche, Basileia, Suíça). Esse sistema tem como base a medida da impedância elétrica após indução da agregação plaquetária. A análise da inibição da ciclo-oxigenase-1 (COX-1), via de ação do AAS, foi realizada utilizando *ASPItest* (Roche, Basileia, Suíça) que contém ácido araquidônico, um agonista específico da COX-1. Paralelo a esse teste a função plaquetária também foi avaliada utilizando o *TRAPtest* (Roche, Basileia, Suíça), que contém o peptídeo-6 ativador do receptor de trombina (TRAP-6), um potente ativador de plaquetas (faixa normal: 84-128). Todas as etapas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados do *ASPItest* foram utilizados para classificar os pacientes durante a visita 1, como respondedores e não respondedores ao AAS (von Pape *et al.*, 2007) (Anexo H).

Fonte: Peerschke *et al.*, 2014

Figura 7 - Fotografia mostrando o aparelho utilizado para medir a agregação plaquetária – Multiplate

O procedimento contém as seguintes etapas:

- 1 Ligar o aparelho *Multiplate* (Figura 7) para chegar à temperatura de 36 graus Celsius;
- 2 A temperatura da sala de experimento do Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia (LIMC) deve estar em 21 graus;
- 3 Coloca-se o tubo de hirudina (tampa branca) no aparelho *Multiplate*, e aguarda-se a temperatura de 36 graus Celsius;
- 4 Também foi preparado um tubo com cloreto de sódio a 20%, 5ml, no aparelho até chegar à temperatura de 36 graus Celsius;
- 5 Liga-se o conector do *Multiplate* ao TEST CELL (pequeno receptáculo no qual se coloca a amostra sanguínea do paciente);
- 6 Início do procedimento – Measurement;
- 7 Pipetagem Eletrônica;
- 8 Identificação do paciente na tela do *Multiplate*: AAS2 – iniciais do paciente – número do Registro no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – número do paciente no Estudo – data do experimento;

- 9 Seleciona-se o ASPI TEST (tubo com hirudina);
- 10 Seleciona-se o TRAP TEST (tubo com hirudina; controle – reagente para o receptor de trombina);
- 11 Pipeta-se 300 microlitros de cloreto de sódio e coloca-se em cada TEST CELL;
- 12 Homogeneização do tubo com amostra de sangue em hirudina manualmente;
- 13 Pipeta-se 300 microlitros da amostra (sangue) e coloca-se em cada TEST CELL;
- 14 Aguardam-se três minutos para cada TEST CELL;
- 15 Pipetam-se 20 microlitros dos reagentes ASPI e TRAP separadamente;
- 16 Coloca-se no TEST CELL separadamente ASPI (ácido acetilsalicílico e TRAP – controle);
- 17 Aguardam-se 6 minutos;
- 18 Observa-se a imagem das curvas no visor do *Multiplate*;
- 19 A diferença entre as curvas deve ser menor ou igual a 20%.

Realiza-se o preparo de alíquotas de soro e plasma para o estudo dos polimorfismos da seguinte forma:

- 1 Colocamos na centrífuga o tubo seco (tampa amarela), aguardamos 10 minutos e extraímos o soro;
- 2 Colocamos o tubo com EDTA (tampa lilás), centrifuga-se por 6 minutos e extrai-se o plasma;
- 3 Identificação: separam-se três microtubos para o soro e coloca-se meio microlitro em cada microtubo. Separam-se três microtubos para o plasma e coloca-se meio microlitro em cada microtubo;
- 4 Identificação dos microtubos: AAS2 – número do paciente no estudo – iniciais do paciente – data da coleta – identificação soro ou plasma;
- 5 Colocamos em refrigeração – 18 graus Celsius.

Massachusetts, USA). As leituras foram realizadas em duplicata e monitoradas utilizando-se a curva padrão fornecida pelo fabricante.

11.4 Análise de polimorfismos

Nesse estudo, foram analisados polimorfismos genéticos relacionados com a atividade do AAS, como os SNPs rs3842787 e rs3842798 do gene *PTGS1* que codifica para a enzima Ciclo-oxigenase 1 (COX-1), e o SNP rs5918 no gene *ITGB3* que codifica para a Glicoproteína IIIa (GPIIIa), subunidade do receptor de fibrinogênio. A escolha desses SNPs foi realizada com base nas informações disponíveis no banco de dados dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

11.5 Técnicas de Biologia Molecular

11.5.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total periférico, pelo *QIAamp[®] DNA Blood Max Kit* (QIAGEN, GmbH, Alemanha), utilizando o sistema automatizado *QIAcube* (QIAGEN, GmbH, Alemanha). A quantificação dos DNAs obtidos foi determinada pelo método fluorimétrico *QUBIT[®]* (*Life Technologies, Forest City, USA*). A integridade das amostras extraídas foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2,0mM pH 8.0), em cuba de eletroforese horizontal. A separação eletroforética foi realizada por 30 minutos a 100V e 60mA, utilizando fonte modelo EPS 200 (*GE Healthcare, Amersham Bioscience do Brasil, São Paulo, SP*). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, após incorporação do corante *Gel RedTM* (*Biotium Inc, Hayward, California, EUA*) (Anexo I).

11.5.2 Sequenciamento de Sanger

De cada um dos três polimorfismos foram selecionadas algumas amostras para a identificação dos 3 três genótipos por sequenciamento de Sanger que pudessem ser usados como controle na reação da PCR em tempo real (ver Figuras 1, 2 e 3) (Verlengia *et al.*, 2013).

11.5.3 Reação em cadeia da polimerase

Previamente ao sequenciamento, foi realizada uma amplificação pela PCR da região contendo o polimorfismo (Gibson *et al.*, 1996; Whitcombe *et al.*, 1999; Persson *et al.*, 2005; Mane *et al.*, 2008; Verlengia *et al.*, 2013). Para isso, foram selecionados oligonucleotídeos iniciadores com o auxílio do programa *Primer3* v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), e das sequências disponíveis nos bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Os iniciadores selecionados para a amplificação, bem como o tamanho do *amplicon*, estão listados no Quadro 1.

Quadro 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação das regiões contendo os polimorfismos

Polimorfismo	Iniciador senso (5'→3')	Iniciador antisenso (5'→3')	produto (pb)
<i>PTGS1</i> rs3842787 C>T	CAGAGGAAGTAAGCGGGCAG	CCCCATCCCACCAAAGACT	497
<i>PTGS1</i> rs3842798 C>T	GGGGATAGGAGTGGAAATAGGG	CTATGAGGATGAGGCGGGTC	496
<i>ITGB3</i> rs5918 T>C	TGCTCCAATGTACGGGGTAA	TCCCCAAGACTTCCTCCTCA	396

Legenda: pb=pares de base.

A amplificação das regiões de interesse foi realizada utilizando DNA genômico dos pacientes como molde, 1U da enzima *Taq* DNA Polimerase (DNA Express Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1X do tampão de PCR (DNA Express Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 200µM de cada dNTP (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, Inglaterra), e 100nM de cada oligonucleotídeo iniciador (DNA Express Biotecnologia, São Paulo, Brasil), em termociclador Veriti (*Applied*

Biosystems, Massachusetts, USA). A PCR ocorreu nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos com uma desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 62°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1min, e, ao término dos ciclos, uma extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram analisados por separação eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (Tris-HCl 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2,0mM pH 8,0), em cuba de eletroforese horizontal. A separação foi realizada por 30 minutos a 100V e 60mA, utilizando fonte modelo EPS 200 (*GE Healthcare*, Amersham Bioscience do Brasil, São Paulo, SP). O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta, após incorporação do corante Gel Red TM (*Biotium Inc*, Hayward, California, EUA) na amostra. Os produtos da PCR que possuíam fragmentos de tamanho esperado e ausência de fragmentos inespecíficos foram purificados utilizando o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, Inglaterra). Os produtos da PCR purificados foram enviados para o sequenciamento (Anexos J e K)

11.5.4 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil) utilizando o equipamento *ABI 3730 DNA Analyser* (*Life Technologies – Applied Biosystems*) e o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*). As corridas foram feitas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. Os resultados do sequenciamento foram analisados, inicialmente, no Instituto de Biociências empregando o *software Sequencing Analysis 5.3.1*, utilizando o Base Caller KB, e, posteriormente, analisadas no nosso laboratório com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

Figura 9 – Seleção dos genótipos do polimorfismo rs 3842787C>T do gene *PTGS1*.

A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR.

B. Região do eletroferograma do sequenciamento de *Sanger* mostrando a posição da troca.

C. Perfil de amplificação pela PCR em tempo real utilizando sondas marcadas com o fluoróforos FAM (Alelo T) e VIC (Alelo C).

Figura 10 – Seleção dos genótipos do polimorfismo rs 3842798 C>T do gene *PTGS1*.

A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR.

B. Região do eletroferograma do sequenciamento de *Sanger* mostrando a posição da troca.

C. Perfil de amplificação pela PCR em tempo real utilizando sondas marcadas com o fluoróforos FAM (Alelo T) e VIC (Alelo C).

Figura 11 – Seleção dos genótipos do polimorfismo rs 5918 T>C do gene *ITGB3*.

A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR.

B. Região do eletroferograma do sequenciamento de *Sanger* mostrando a posição da troca.

C. Perfil de amplificação pela PCR em tempo real utilizando sondas marcadas com o fluoróforos FAM (Alelo C) e VIC (Alelo T).

11.5.5 PCR em tempo real

Os polimorfismos listados na Tabela 1 foram detectados por meio da técnica de PCR em Tempo Real ou PCR quantitativa (qPCR), utilizando o sistema de detecção *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assay* (Life Technologies, Forest City, USA) e o equipamento *RotorGene*[®] (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). Para cada polimorfismo, foram utilizadas duas sondas (cada uma contendo um dos alelos), sendo uma marcada com corante fluorescente 6-carboxifluoresceína (FAM) e a outra marcada com 6-carboxi- 4 ,7, 2', 7'-tetracloro-fluoresceína (VIC).

Na reação de amplificação, além do DNA e dos reagentes do Kit *TaqMan® Genotyping MasterMix* (Life Technologies, Forest City, USA), foram adicionados 0,5µL do ensaio *Taqman® SNP Genotyping Assay 40x* (Life Technologies, Forest City, USA), e água livre de DNase em um volume final de 20µL. Para todas os ensaios, foram utilizados controles negativos (sem adição de DNA) a fim de verificar possíveis contaminações dos reagentes. A qPCR ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de 10 min a 95°C (ativação da enzima Hot Star Taq); 50 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 90 segundos a 60°C (hibridização e extensão). Ao final das reações, aproximadamente, 10% das amostras foram, novamente, genotipadas, com o objetivo de validar os resultados. Os dados foram analisados utilizando o programa *Rotor-Gene Q – Pure detection* (QIAGEN, GmbH, Alemanha).

Tabela 1 – Relação dos polimorfismos e especificações dos ensaios utilizados na genotipagem pela qPCR

Gene	Número de Catalogo	Troca	Marcação
<i>PTGS1</i> rs3842787	C__30252576_20	[C / T]	[VIC/FAM]
<i>PTGS1</i> rs3842798	C__22272981_10	[C / T]	[VIC/FAM]
<i>ITGB3</i> rs5918	C__818008_30	[T / C]	[FAM/VIC]

12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo *software* SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Antes de efetuar os testes de comparações das variáveis quantitativas, foi avaliado se os parâmetros seguiam uma distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para dados com distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico *t Student*. Para os demais dados, foram utilizados os testes não paramétricos *Mann-Whitney* ou *Wilcoxon*. Para comparar as frequências das variáveis qualitativas, foi realizado o teste de qui-quadrado (χ^2).

13 RESULTADOS

Foram selecionados 175 pacientes com de doença arterial coronária crônica e em uso de AAS porém por diversas razões como desistência, problemas de saúde e falecimento, distância geográfica, só foram incluídos no estudo 152 indivíduos de ambos os sexos com idade entre 31 e 81 anos. No início do estudo todos os pacientes faziam uso de 100mg AAS por dia (forma convencional). Após a primeira consulta os pacientes foram divididos em dois grupos: um que passou a tomar além dos 100mg de AAS 1g de Ômega 3 (grupo O3), e um segundo grupo que passou a tomar 200mg de AAS por dia (grupo AAS 200).

13.1 Dados biodemográficos

A Tabela 2 apresenta as características biodemográficas da população do estudo. Os resultados mostram que a distribuição dos pacientes nos dois grupos de tratamento foi homogênea.

Tabela 2 - Características biodemográficas da população do estudo

	AAS 200 (N= 81)	O3 (N= 71)	P
GÊNERO	F= 21 (25,9%)	F= 20 (28,2%)	0,756 ^A
	M= 60 (74,1%)	M= 51 (71,8%)	
ETNIA	B= 47 (58,0%)	B= 49 (69,0%)	0,495 ^B
	P= 23 (28,4%)	P= 16 (22,5%)	
	N= 8 (9,9%)	N= 5 (7,0%)	
	A= 3 (3,7%)	A= 1 (1,4%)	
IDADE (ANOS)	60,80 ± 7,75	61,10 ± 7,24	0,888 ^C
ALTURA (M)	1,65 ± 0,09	1,66 ± 0,08	0,717 ^C
PESO (KG)	81,18 ± 16,91	81,68 ± 14,35	0,450 ^C
CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL (CM)	101,6 ± 12,23	100,9 ± 14,97	0,808 ^C
IMC (KG/ M ²)	29,57 ± 4,79	29,64 ± 5,02	0,698 ^C

Legenda: B=Branco, P=Pardo, N=Negro; A=Asiático; IMC = Índice de Massa Corpórea; ^APearson Qui-quadrado; ^B Likelihood ratio; ^C Mann – Whitney.

Com relação aos principais sinais e sintomas, histórico de doenças, bem como, à presença de fatores de risco para doença cardíaca, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AAS200 e O3 (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3 - Principais sinais e sintomas da população do estudo

	AAS 200 (N= 81)		O3 (N= 71)		P ^A
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	
DISPNEIA	17 (23,9%)	54 (76,1%)	74 (56,1%)	17 (23,9%)	0,309
ANGINA	40 (49,4%)	41 (50,6%)	40 (56,3%)	31 (43,7%)	0,392
PALPITAÇÕES	24 (29,6%)	57 (70,4%)	20 (28,2%)	51 (71,8%)	0,843
TONTURAS	29 (35,8%)	52 (64,2%)	22 (31,0%)	49 (69,0%)	0,530
SÍNCOPEs	8 (10,0%)*	72 (90,0%)*	13 (18,6%)*	57 (81,4%)*	0,131
EDEMA DE MI	36 (44,0%)	45 (55,6%)	26 (36,6%)	45 (63,4%)	0,327
SINTOMAS DIGESTIVOS	28 (34,6%)	53 (65,4%)	25 (35,7%)*	45 (64,3%)*	0,883

Legenda: MI = membro inferior; *corresponde aos dados faltantes nos grupos; ^a Pearson Qui-quadrado.

Tabela 4 - Histórico de doenças dos pacientes nos grupos AAS 200 e O3

	AAS 200 (N= 81)		O3 (N= 71)		P
	Sim	Não	Sim	Não	
Hipertensão Arterial	75 (92,6%)	6 (7,4%)	65 (91,5%)	6 (8,5%)	0,812 ^a
Dislipidemia	78 (96,3%)	3 (3,7%)	64 (90,1%)	7 (9,9%)	0,124 ^b
Diabetes	42 (51,9%)	39 (48,1%)	34 (47,9%)	37 (52,1%)	0,626 ^a
Acidente vascular encefálico	4 (4,9%)	77 (95,1%)	6 (8,5%)	65 (91,5%)	0,383 ^b
Acidente isquêmico transitório	0 (0%)	78 (96,3%)*	1 (1,4%)	70 (98,6%)	0,222 ^b
Doença arterial periférica	32 (40,0%)*	48 (60,0%)*	29 (40,8%)	42 (59,2%)	0,916 ^a
Infarto agudo do miocárdio	57 (70,4%)	24 (29,6 %)	42 (59,2%)	29 (40,8%)	0,148 ^a
Obesidade	30 (38,0%)*	49 (62,0%)*	19 (27,1%)*	51 (72,9%)*	0,160 ^a
Revascularização do miocárdio	63 (77,8%)	18 (22,2%)	61 (85,9%)	10 (14,1%)	0,197 ^a
Angioplastia	36 (45,6%)*	43 (54,4%)*	26 (37,1%)*	44 (62,9%)*	0,298 ^a
Remanescente de morte súbita	5 (6,3%)	75 (93,8%)	5 (7,0%)	66 (93,0%)	0,845 ^b
Marca-passo	2 (2,5%)	79 (97,5%)	0 (0%)	71 (100%)	0,111 ^b

continua

					conclusão
	AAS 200 (N= 81)		O3 (N= 71)		p
	Sim	Não	Sim	Não	
Cardiodesfibrilador implantável	1 (1,2%)	80 (98,8%)	1 (1,4%)	70 (98,6%)	0,925 ^b
Arritmia	19 (23,5%)	62 (76,5%)	9 (12,7%)	62 (87,3%)	0,087 ^a
Insuficiência cardíaca	73 (90,1%)	8 (9,9%)	61 (85,9%)	10 (14,1%)	0,423 ^a
Alergias	11 (13,6%)	70 (86,4%)	15 (21,1%)	56 (78,9%)	0,218 ^a

Legenda: *corresponde aos dados faltantes nos grupos; ^a Qui-quadrado; ^b Likelihood ratio.

Tabela 5 - Fatores de risco para doença cardíaca

	AAS 200 (N=81)		O3 (N=71)		p
	Sim	Não	Sim	Não	
Pratica atividade física	38 (46,9%)	43 (53,1%)	36 (51,4%)	34 (48,6%)	0,580 ^a
Tabagismo	9 (11,1%)	72 (88,9%)	4 (5,6%)	67 (94,4%)	0,228 ^a
Ex-tabagista	51 (63,0%)	30 (37,0%)	42 (59,2%)	29 (40,8%)	0,631 ^a
Etilismo	37 (45,7%)	44 (54,3%)	28 (39,4%)	43 (60,6%)	0,438 ^a
Ex-etilista	16 (19,8%)	65 (80,2%)	14 (19,7%)	57 (80,3%)	0,996 ^a
Drogas ilícitas	1 (1,2%)	80 (98,8%)	1 (1,4%)	70 (98,6%)	0,925 ^b
Uso de drogas no passado	2 (2,5%)	79 (97,5%)	0 (0%)	71 (100%)	0,111 ^b

Legenda: ^a Pearson Qui-quadrado; ^b Likelihood ratio.

13.2 Determinações laboratoriais

A Tabela 6 apresenta os resultados dos exames laboratoriais. Pode-se verificar que, em ambos os grupos, houve uma redução nos valores de VLDL e triglicérides nos dois grupos após 30 dias de tratamento. Porém, essa redução não foi diferente entre o tratamento com AAS200 e O3. Com o uso de O3, também foi possível observar uma redução no número de monócitos, estatisticamente significante quando comparado ao tratamento com AAS200.

Tabela 6 - Dados laboratoriais da população de estudo

	AAS 200				p ^a	O3				p ^a	p ^b
	Tempo A		Tempo B			Tempo A		Tempo B			
	N	Mediana (25%;75%)	N	Mediana (25%;75%)		N	Mediana (25%;75%)	N	Mediana (25%;75%)		
TTPA (relação)	78	1,05 (0,98; 1,11)	78	1,04 (0,97; 1,08)	0,414	70	1,04 (0,98; 1,11)	68	1,04 (0,97; 1,09)	0,825	0,673
TP (RNI)	78	1,04 (1,00; 1,08)	80	1,02 (0,97; 1,06)	0,060	68	1,04 (1,0; 1,1)	71	1,03 (0,97; 1,10)	0,059	0,995
Dímero-D (ng/mL)	79	470,4 (316,1; 716,5)	80	430,8 (304,2; 727,8)	0,860	68	479,7 (340,8; 806,6)	71	484,9 (338,6; 737,2)	0,316	0,411
Glicose sérica (mg/dL)	79	94 (83; 108)	80	95 (85,2; 111,8)	0,411	69	97 (87; 109)	71	97 (84; 109)	0,383	0,257
Creatinina Sérica (mg/dL)	80	0,9 (0,8; 1,1)	80	0,9 (0,8; 1,1)	0,069	70	0,96 (0,8; 1,1)	71	0,9 (0,8; 1,1)	0,113	0,870
Colesterol (mg/dL)	80	162 (140; 200,25)	80	166 (137,2; 198,8)	0,827	70	161 (140,8; 198,2)	71	159 (136; 189)	0,167	0,183
HDL (mg/dL)	80	44 (38; 51,75)	80	43,5 (39; 52,75)	0,656	70	40,5 (35; 55,25)	71	41 (37; 52)	0,789	0,916
LDL (mg/dL)	80	89,5 (70; 109)	80	87 (70; 119,75)	0,180	70	90 (69,5; 109,25)	71	87 (70; 112)	0,859	0,458
VLDL calculado (mg/dL)	76	29,5 (21; 41)	80	27 (17,25; 38,75)	0,005	69	29 (21; 38)	71	26 (17; 39)	0,006	0,804
Triglicérides (mg/dL)	79	148 (106; 210)	80	135,5 (87,25; 193)	0,002	70	148,5 (104,8; 194)	71	129 (84; 196)	0,004	0,966
Ácido Úrico Sérico (mg/dL)	80	5,7 (4,6; 6,75)	79	5,7 (4,7; 6,9)	0,634	69	5,7 (4,65; 6,80)	71	5,6 (4,8; 6,7)	0,358	0,718
TGO/AST (U/L)	78	27,5 (22; 35,25)	72	27 (22; 32,75)	0,153	66	26 (21; 31,5)	61	26 (21; 30,5)	0,476	0,141
TGP/ALT (U/L)	77	34 (28; 48)	72	37 (29,25; 44,75)	0,773	66	34 (28,75; 41)	61	35 (29; 41,5)	0,048	0,110
Eritrócitos (10 ⁶ /mm3)	80	4,99 (4,64; 5,26)	79	4,85 (4,6; 5,16)	0,107	71	4,95 (4,68; 5,21)	71	4,94 (4,62; 5,19)	0,638	0,423
Hemoglobina (g/dL)	80	14,75 (13,75; 15,40)	79	14,7 (14; 15,4)	0,357	71	14,2 (13,2; 15,2)	71	14,2 (13,4; 15,5)	0,478	0,933
Hematócrito (%)	80	43,7 (40,7; 46,6)	79	43,7 (41,4; 45,7)	0,837	71	42,2 (39,4; 45,7)	71	42,9 (39,5; 45,8)	0,741	0,783
VCM (fl)	80	88,5 (85,15; 90,65)	79	89,1 (86,3; 91,4)	0,025	71	87 (83,6; 90,1)	71	87,3 (84,2; 90,0)	0,383	0,344
HCM (pg)	80	29,65 (28,62; 30,9)	79	30 (28,7; 30,9)	0,822	71	29,3 (27,9; 30,3)	71	29,2 (28,2; 30,2)	0,610	0,624
CHCM (g/dL)	80	33,5 (32,8; 34,4)	79	33,2 (32,4; 34,4)	0,109	71	33,2 (32,5; 34,6)	71	33,4 (32,4; 34,2)	0,362	0,702
RDW (%)	80	13,1 (12,4; 13,5)	79	13,2 (12,6; 13,6)	0,502	71	13,3 (12,7; 14,0)	71	13,2 (12,7; 13,9)	0,814	0,537
Plaquetas (Mil/mm3)	80	220,5 (191; 271,5)	79	216 (188; 268)	0,442	71	220 (188; 271)	71	227 (187; 269)	0,709	0,491
Leucócitos Totais (Mil/mm3)	80	7,5 (6,4; 8,5)	79	7,5 (6,06; 8,59)	0,332	71	7,22 (6,11; 8,98)	71	7,23 (6,1; 8,37)	0,010	0,257

continua

conclusão											
	AAS 200				p ^a	O3				p ^a	p ^b
	Tempo A		Tempo B			Tempo A		Tempo B			
	N	Mediana (25%;75%)	N	Mediana (25%;75%)		N	Mediana (25%;75%)	N	Mediana (25%;75%)		
Neutrófilos (Mil/mm3)	80	4,5 (3,7; 5,3)	79	4,44 (3,65; 5,31)	0,300	71	4,58 (3,34; 5,6)	71	4,45 (3,35; 5,29)	0,012	0,300
Eosinófilos (Mil/mm3)	80	0,2 (0,14; 0,33)	79	0,19 (0,13; 0,39)	0,154	71	0,18 (0,12; 0,29)	71	0,19 (0,12; 0,31)	0,726	0,442
Basófilos (Mil/mm3)	80	0,05 (0,02; 0,07)	79	0,04 (0,03; 0,06)	0,586	71	0,04 (0,03; 0,05)	71	0,04 (0,02; 0,05)	0,704	0,893
Linfócitos totais (Mil/mm3)	80	2,11 (1,73; 2,58)	79	2,09 (1,63; 2,58)	0,085	71	2,03 (1,61; 2,51)	71	1,98 (1,62; 2,41)	0,383	0,640
Monócitos (Mil/mm3)	80	0,45 (0,34; 0,55)	79	0,47 (0,38; 0,57)	0,459	71	0,48 (0,38; 0,57)	71	0,45 (0,35; 0,54)	0,017	0,024
Proteína C Reativa (mg/dL)	80	0,7 (0,5; 1,1)	80	0,80 (0,52; 1,08)	0,067	70	0,6 (0,5; 1,0)	71	0,8 (0,5; 1,2)	0,198	0,600
Urina I Sangue (mg/dL)	73	0,00 (0,00; 0,00)	79	0,0 (0,0; 0,0)	1,000	64	0,0 (0,0; 0,0)	68	0,0 (0,0; 0,0)	0,317	0,450
Urina I Leucócitos (/mL)	73	2000 (1000; 7500)	79	2000 (1000; 5000)	0,561	64	3000 (1250; 7000)	68	3000 (2000; 8000)	0,617	0,984
Urina I Hemácias (/mL)	73	1000 (1000; 3000)	79	1000 (1000; 3000)	0,708	64	1000 (1000; 3000)	68	1000 (1000; 3000)	0,692	0,921

Legenda: TTPA=tempo de tromboplastina parcialmente ativada; TP= tempo de protrombina; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média CHCM= Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW=Distribuição das superfícies de eritrócitos (*Red Cell Distribution Width*); ^a Comparação ao longo do tempo (Tempo B – Tempo A) em cada um dos grupos por teste *Wilcoxon*; ^b Comparação da resposta ao longo do tempo (Tempo B – Tempo A) entre os grupos AAS200 e O3 comparado por teste *Mann-Whitney*. Nota: Valores expressos em mediana e intervalo interquartil.

13.3 Genotipagem

Foram analisados polimorfismos nos genes *PTGS1* e *ITGB3*. Após a genotipagem, o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi calculado para a população do estudo. De acordo com a Tabela 7, a distribuição genotípica da população estudada estava de acordo com as previsões da lei de *Hardy-Weinberg*.

Tabela 7 - Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos rs3842787 e rs3842798 no gene *PTGS* e, rs5918 no gene *ITGB3* na população do estudo

Genes	Genótipos			Alelos		P valor* (χ^2)
<i>PTGS</i> rs3842787 C→T	CC	CT	TT	C	T	
	85,8% (127)	13,5% (20)	0,7% (1)	92,6% (274)	7,4% (22)	0,83 (0,05)
<i>PTGS</i> rs3842798 C→T	CC	CT	TT	C	T	
	6,8% (10)	45,3% (67)	47,9% (71)	29,4% (87)	70,6% (209)	0,27 (1,22)
<i>ITGB3</i> rs5918 T→C	TT	TC	CC	T	C	
	76,4% (110)	22,2% (32)	1,4% (2)	87,5% (252)	12,5% (36)	0,44 (0,59)

Legenda: *Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o teste χ^2 .

Nota: Número de indivíduos entre parênteses.

13.4 Respondedores *versus* não respondedores

No início do estudo, em todos os pacientes que faziam uso de 100mg de AAS (AAS100) diariamente, foi avaliada a função plaquetária, e, com base nos resultados desse teste, os pacientes foram classificados em respondedores e não respondedores. Do total de 152 pacientes, 38 (25,2%) não responderam ao tratamento com AAS100. A partir disso, analisamos a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos estudados entre os grupos de respondedores e não respondedores ao AAS (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação das frequências genotípicas para os polimorfismos rs3842787 e rs3842798 no gene *PTGS1* e no rs5918 no gene *ITGB3* entre os grupos de respondedores e não respondedores ao AAS100

Polimorfismos	Genótipos			Alelo	
<i>PTGS1</i> rs3842798	CC	CT	TT	CC	CT + TT
R (110)	6,3% (7)	46,4% (51)	47,3 % (52)	6,3%(7)	93,6 % (103)
NR (38)	7,9% (3)	42,1% (16)	50% (19)	7,9% (3)	92,1% (35)
	p= 0,881^b			p= 0,750^b	
<i>PTGS1</i> rs3842787	CC	CT	TT	CC	CT + TT
R (110)	83,6% (92)	15,4% (17)	1% (1)	83,6% (92)	16,4% (18)
NR (38)	92,1% (35)	7,9% (3)	0% (0)	92,1% (35)	7,9% (3)
	p= 0,339^b			p= 0,197^a	
<i>ITGB3</i> rs5918	CC	TC	TT	CC + TC	TT
R (110)	1,8% (2)	26,4% (29)	71,8% (79)	28,2% (31)	71,8% (79)
NR (38)	0% (0)	18,4% (7)	81,6% (31)	18,4% (7)	81,6% (31)
	p= 0,314^b			p= 0,274^b	

Legenda: R= respondedores; NR= Não respondedores. Comparação entre os grupos R e NR realizada por ^a Pearson Qui-quadrado; ^b Likelihood ratio. **Nota:** Número de indivíduos entre parênteses.

Não foi verificada nenhuma diferença estatística entre os grupos. Portanto, a presença do alelo raro estava igualmente distribuída entre os respondedores e não respondedores.

13.5 Grupo AAS200 versus grupo ômega 3

A Tabela 9 mostra as frequências genotípica e alélica dos polimorfismos estudados entre os grupos de tratamento. Entretanto, assim como para respondedores e não respondedores, não foi verificada nenhuma diferença estatística entre os grupos AAS200 e Ômega 3.

Tabela 9 - Comparação das frequências genotípicas para os polimorfismos rs3842787 e rs3842798 no gene *PTGS1* e no rs5918 no gene *ITGB3* entre os grupos AAS200 e O3

Polimorfismos	Genótipos			Alelo	
<i>PTGS1</i> rs3842798 C→T	CC	CT	TT	CC	CT + TT
AAS 200 (77)	6,5% (5)	42,9% (33)	50,6 % (39)	5	72
O3 (71)	7,0% (5)	47,9% (34)	45,1% (32)	5	66
	p= 0,794 ^a			p=0,894 ^a	
<i>PTGS1</i> rs3842787 C→T	CC	CT	TT	CC	CT + TT
AAS 200 (77)	88,3% (68)	11,7% (09)	0% (0)	68	9
O3 (71)	83,1% (59)	15,5% (11)	1,4% (1)	59	12
	p= 0,371 ^b			p=0,364 ^a	
<i>ITGB3</i> rs5918 T→C	TT	TC	CC	TT	TC + CC
AAS 200 (77)	72,7% (56)	24,9% (19)	2,6% (2)	21	56
O3 (71)	76,1% (54)	23,9% (17)	0% (0)	17	54
	p= 0, 262 ^b			p=0,643 ^a	

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Comparação entre os grupos ASS200 e O3 realizada por ^a Pearson Qui-quadrado; ^b Likelihood ratio.

13.6 Análise de agregação plaquetária e dosagem de tromboxane

De acordo com a Figura 12, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento com relação à função plaquetária (*ASPIteste* e *TRAPteste*) e produção de tromboxane B2 (TBX2). Os valores de *TRAPteste* estavam dentro da faixa esperada (84-128), demonstrando que a função plaquetária estava preservada nesses pacientes. Verificou-se, também, que não houve correlação entre os resultados de *ASPIteste* e concentração plasmática de TBX2 (Tabela 10).

Figura 12 – Comparação do efeito do tratamento sobre a função plaquetária e produção de TBX2.

A= resposta ao AAS100 (visita 1).

B= Resposta após 30 dias de tratamento com AAS200 ou O3 (visita 2).

Nota: Valores expressos em mediana e intervalo interquartil. Comparação por teste Mann-Whitney

Tabela 10 - Avaliação da correlação entre os resultados de *ASPI*teste e concentração plasmática de tromboxane B2

	ASP	TBX2
Coefficiente de correlação	1,000	0,051
Valor de p*		0,708
N	150	57

Legenda: *Correlação de Spearman.

Quando se analisaram os resultados do teste de função plaquetária e concentração plasmática de TBX2, entre os pacientes classificados como respondedores e não respondedores ao AAS, verificou-se que a redução dos valores de *ASPI*teste foi mais significativa no primeiro grupo (NR) do que o segundo(R) (Figura 13).

Figura 13 - Comparação dos resultados de função plaquetária e produção de tromboxane B2 entre grupos respondedores (**R**) e não respondedores (**NR**).

A= resposta ao AAS100 (visita 1).

B= Resposta após 30 dias de tratamento com AAS200 ou O3 (visita 2).

Nota: Valores expressos em mediana e intervalo interquartil. Comparação por teste Mann-Whitney.

Além disso, quando se analisaram os grupos de respondedores e não respondedores separadamente, foi possível observar uma correlação entre resultados do teste de função plaquetária e tromboxane B2 no grupo dos respondedores (Tabela 11).

Tabela 11 - Avaliação da correlação entre os resultados de *ASPI*teste e concentração plasmática de tromboxane B2

	Não respondedor		Respondedor	
	ASP	TBX2	ASP	TBX2
Coefficiente de correlação	1,000	-0,095	1,000	0,356
Valor de p*		0,667		0,039
N	39	23	111	34

Legenda: *correlação de Spearman.

Estratificando os respondedores e não respondedores por grupos de tratamento (Figura 14), pode-se notar que, embora o efeito do tratamento não tenha sido estatisticamente diferente entre os grupos, é possível observar que, naqueles pacientes que fizeram uso de AAS200 por 30 dias, e que foram classificados como não respondedores, os valores do *ASPI*teste caíram para o nível que os reclassificam como respondedores (<40), o que não ocorreu com o uso de O3.

Figura 14 – Efeito do tratamento sobre função plaquetária e concentração plasmática de Tromboxane B2 em respondedores e não respondedores ao AAS.

A= resposta ao AAS100 (visita 1).

B= Resposta após 30 dias de tratamento com AAS200 ou O3 (visita 2).

Nota: Valores expressos em mediana e intervalo interquartil. ^aTeste Mann-Whitney; ^bTeste *t student*.

Com relação ao efeito do tratamento sobre respondedores e não respondedores separadamente, é possível ver que apenas no grupo dos não respondedores houve uma redução significativa dos valores de *ASPIteste*. Porém, apenas no tratamento com o AAS200, os valores de *ASPIteste* caíram para níveis de respondedores (<40) (Figura 15).

Figura 15 – Efeito do tratamento sobre função plaquetária e concentração plasmática de Tromboxane B2 em respondedores (**R**) e não respondedores (**NR**) ao AAS.

A= resposta ao AAS100 (visita 1).

B= Resposta após 30 dias de tratamento com AAS200 ou O3 (visita 2).

Nota: Valores expressos em mediana e intervalo interquartil. ^aTeste Mann-Whitney; ^bTeste *t student*.

A Tabela 12 mostra que a presença do alelo raro do polimorfismo rs3842787 do gene *PTGS1* estava associado com uma pior resposta do *ASPI* teste, enquanto que pacientes com o alelo raro do polimorfismo rs5918 no gene *ITGB3* apresentaram uma pior resposta com relação à concentração de tromboxane B2 após os 30 dias de tratamento.

Tabela 12 - Efeito do alelo raro sobre os resultados de *ASPIteste* e concentração plasmática de tromboxane B2 (TBX2)

Polimorfismo	Mediana (25%;75%)	Mediana (25%;75%)	
<i>PTGS1</i> rs3842798 C>T	CC	CT + TT	p ^a
ASPteste_A (AU)	18,5(8,5;59)	23(15,8;42,5)	0,492
ASPteste_B (AU)	14,5(9,5;27)	22(15;36,5)	0,085
ASPteste_delta (AU)	-9,0(-38,8;2,2)	-2,0(-15,5;7,5)	0,214
TBX2_A (pg/mL)	128,8(38,1;-)	163,6(84,5; -)	0,775
TBX2_B (pg/mL)	167,9(91,5; -)	116,6(60,9; -)	0,335
TBX2_delta (pg/mL)	129,8(-276,3; -)	-34,3(-113,2; -)	0,282
<i>PTGS1</i> rs3842787 C>T	CC	CT + TT	p ^a
ASPteste_A	25(17;51)	18(12,5;22)	0,023
ASPteste_B	22(13;36)	21(17;33)	0,810
ASPteste_delta	-3,0(-18;5)	4,0(0,25;11,75)	0,028
TBX2_A	170,7(82,3;292,5)	100,1(62,9;140,9)	0,108
TBX2_B	116,6(65,2;199,9)	127,9(53,6;202,3)	0,693
TBX2_delta	-44,5(-120,9;37,9)	27,81(-13,7;65,8)	0,114
<i>ITGB3</i> rs5918 T>C	TT	TC + CC	p ^a
ASPteste_A	20 (15,75;34,5)	23,5(15;55,25)	0,446
ASPteste_B	21,5(12,75;42;75)	22(14,5;32)	0,792
ASPteste_delta	0(-15;8)	-2,0(-18;6)	0,388
TBX2_A	224,3(92; 327,4)	162,0(81,3;162)	0,181
TBX2_B	90,6(69,6;90,6)	128,3(58,3;128,3)	0,418
TBX2_delta	-118,9(-247,8;-11,8)	-4,6(-72,8;86)	0,013

Legenda: A= resposta ao AAS100 (visita 1). B= Resposta após 30 dias de tratamento com AAS200 ou O3 (visita 2). Delta = B-A. ^a Comparação por teste Mann-Whitney.

14 DISCUSSÃO

A despeito de avanços médicos recentes, a doença aterotrombótica vascular permanece como causa majoritária de morbidade e mortalidade no mundo ocidental. Neste cenário, as plaquetas desempenham papel fisiopatológico fundamental no processo trombótico provendo a hemóstase inicial que acompanha a injúria vascular e precipita a formação do trombo nos pacientes com doença aterosclerótica. Tal processo pode causar infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico e eventos vasculares periféricos. Os agentes antiplaquetários, em particular, o ácido acetilsalicílico, tem um papel proeminente tanto na prevenção primária como na secundária da doença cardiovascular, como é evidenciado pelo grande número de estudos clínicos de larga escala na literatura. Entretanto, apesar de seu comprovado benefício, eventos recorrentes regulares permanecem comuns, em 10-20% dos pacientes com história prévia de doença cardiovascular. O fato de alguns pacientes não serem protegidos pelo efeito antiplaquetário do ácido acetilsalicílico levou à criação do conceito de não resposta ou resistência ao ácido acetilsalicílico. É reconhecido que a resposta a outros agentes antiplaquetários (como o clopidogrel, por exemplo) não é uniforme. Esse contexto clínico de diferenças na ação antiplaquetária permanece em debate e levanta a possibilidade da criação de uma terapia específica para cada paciente.

O ácido acetilsalicílico é hidrolisado no estômago em ácido salicílico e ácido acético. Ambos são ácidos fracos rapidamente absorvidos. As concentrações plasmáticas de ácido acetilsalicílico ocorrem no pico de uma hora após sua ingestão e tem rápida eliminação: meia-vida de 20 a 40 minutos. Os níveis de salicilato chegam ao pico de 1 a 24 horas com meia-vida de cerca de 2 a 4 horas. Após 6 horas pós-ingestão, é possível detectar níveis de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico em um esquema de uso de baixa dosagem diária de ácido acetilsalicílico. O metabolismo é hepático (circulação porta). Após a conjugação hepática, os salicilatos são excretados pelo rim dentro de 1 hora após a dose.

O ácido acetilsalicílico atua na prevenção da agregação plaquetária por meio da inibição irreversível da enzima ciclo-oxigenase, reduzindo a produção do tromboxano plaquetário. Como as plaquetas são anucleadas, o efeito inibitório do ácido acetilsalicílico na produção do tromboxano permanece até que as plaquetas sejam repostas (10% ao dia), o que significa que a administração de baixas doses de ácido acetilsalicílico pode eventualmente inibir a produção de tromboxano. Os anti-inflamatórios não esteroidais são competidores reversíveis da ciclo-oxigenase 1, provendo inibição plaquetária transitória e, ainda, mascarando a ação do ácido acetilsalicílico pela competição ao acesso do receptor na membrana plaquetária.

O ácido acetilsalicílico é o agente antiplaquetário mais largamente prescrito na prevenção secundária de acidente vascular encefálico (previne 1/5 de recorrência dos ataques).

Em uma metanálise que contemplou 287 estudos realizada pelo *Antithrombotic Trialists Collaboration* (2002) envolvendo 135.000 pacientes com alto risco para eventos vasculares oclusivos, a terapêutica antiplaquetária resultou em 25% de redução para qualquer evento vascular grave ($P < 0.0001$), 34% redução para infarto agudo miocárdio não fatal ($P < 0.0001$) e 25% redução para acidente vascular encefálico não fatal ($P < 0.0001$). Doses de ácido acetilsalicílico entre 75-100 mg, diariamente, mostraram-se tão efetivas quanto doses maiores no presente estudo, utilizamos 100mg por dia, o que está de acordo com a literatura. Ademais, a eficácia de doses menores que 75mg por dia permanece obscura. Metanálises de estudos incluindo cerca de 55.000 pacientes mostraram um risco relativo de redução de 32% para infarto agudo do miocárdio e 15% de redução para qualquer evento vascular importante. Entre estes pacientes com doença vascular estabelecida, a taxa de ocorrência anual de um evento grave vai de 4 a 8%. O ácido acetilsalicílico previne de 10-20% de eventos vasculares não fatais para cada 1.000 pacientes tratados por um ano portanto, 30-60 eventos vasculares são esperados para cada 1.000 pacientes tratados com ácido acetilsalicílico, não por causa da não resposta, mas devido à natureza multifatorial da aterotrombose.

Entretanto, pondera-se a existência da não resposta (resistência) ao ácido acetilsalicílico; tendo-se em perspectiva o fato de que a medicina personalizada (translacional) está às portas e é cada vez mais reconhecido que os pacientes

respondem de modo diferente aos agentes antiplaquetários, em particular, que alguns tenham um grau de resistência ao fármaco.

A resistência: não respondedor pode ser definida tanto clínica como em termos de mensuração laboratorial.

A não resposta ao ácido acetilsalicílico em termos clínicos pode ser considerada como a falência do ácido acetilsalicílico em prevenir eventos aterotrombóticos vasculares (IAM, AVE), talvez fosse melhor denominada falência terapêutica.

Neste trabalho a definição de respondedor e não respondedor baseou-se na função plaquetária, determinada *in vitro* utilizando a plataforma Multiplate. Os resultados do *ASPIteste* para os respondedores tinham como limite: 30 AU muito bom respondedor, de 30-40 AU respondedor e valores maiores que 40, não respondedor em uso do AAS.

Os mecanismos de não resposta ao ácido acetilsalicílico oferecem uma possibilidade de mudança do tratamento considerando que a não resposta ao ácido acetilsalicílico é multifatorial, ou, ao menos, é diferente de um indivíduo para o outro.

Com relação às características biodemográficas da população do estudo, houve uma distribuição homogênea dos pacientes nos dois grupos de tratamento. No grupo AAS 200, 25,9% dos indivíduos eram do sexo feminino (21 pacientes) e, no grupo ômega 3, 28,2% (20 pacientes), enquanto que 74,1% eram do sexo masculino no grupo AAS 200 e 71,8% no grupo ômega 3. Quanto à idade, $60,8 \pm 7,75$ anos no grupo AAS 200 e $61,1 \pm 7,24$ anos. Quanto ao IMC, encontramos $29,57 \pm 4,79$ no grupo AAS 200 e $29,64 \pm 5,02$ no grupo ômega 3. (pré-obesidade – obeso grau I). Estes dados estão em acordo com a literatura (Xu *et al.*, 2012).

Com referência aos principais sinais e sintomas, histórico de doenças, fatores de risco para doença cardíaca, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AAS 200 e ômega 3: angina, tonturas, edema de MMII. Com relação aos sintomas digestivos (dispepsia, sintomas gastrointestinais), no grupo AAS 200, foi discretamente maior que no grupo ômega 3. O histórico médico dos pacientes nos dois grupos mostrou a preponderância de dislipidemia, ausência de AVE prévio e acidente isquêmico transitório (apenas 1 paciente do grupo ômega 3), doença arterial

periférica, obesidade, presença de arritmias e ausência de alergias também se destacaram.

Com relação ao papel dos ácidos graxos na aterotrombose no grupo ômega 3, houve diminuição dos monócitos, participantes ativos na formação inflamatória do trombo. A ingesta de ácidos graxos ômega 3 reduziu a atividade inflamatória em 30% após 4 semanas (Baumann *et al.*, 1999; Lavie *et al.*, 2009).

Dos fatores de risco para doença cardíaca destaca-se o tabagismo, pois houve abandono do hábito de fumar nos 2 grupos, a prática de atividade física foi similar nos dois grupos, com o grupo AAS 200 tendo 53,1% de sedentários contra 48,6% no grupo ômega 3. Por outro lado, a presença de ex-etilistas foi similar nos dois grupos.

Em ambos os grupos, houve redução nos valores do VLDL e triglicérides após 30 dias de tratamento, mas essa redução não foi diferente com AAS 200 e ômega 3.

“Fish oil is a whale of a story, that not surprisingly gets bigger with every telling” (Rogans, 1987). A obtenção de ácidos graxos ômega 3 se dá pela ingesta de óleo de peixe (albacora, salmão, atum, sardinhas) ou pela adição de suplementos com óleo de peixe. Não há produção endógena de ácidos graxos ômega 3. A dose utilizada neste estudo foi 1 grama por dia por ser facilmente tolerada pelos pacientes e causar menos efeitos colaterais (hálito com gosto de peixe, flatulência, alteração gastrointestinal, sangramento) e a apresentação usada nesse estudo é segura e foi bem tolerada nos dois grupos (Finzi *et al.*, 2011).

A ingesta de peixe ou outras fontes de ácidos graxos ômega 3 tem sido vista como uma estratégia possível para a prevenção da aterosclerose (Sacks *et al.*, 1995). Centenas de estudos epidemiológicos e de mecanismos de ação mostraram o potencial antiaterosclerótico dos ácidos graxos ômega 3.

Estudos clínicos têm mostrado este benefício. O estudo DART (Burr *et al.*, 1989) (*The Diet and Reinfarction Trial*) mostrou 29% de redução da mortalidade nos sobreviventes de infarto agudo no miocárdio com 1g de ácidos graxos ômega 3 a 2 vezes por semana por um período de 2 anos. Pasternak e colaboradores (Parternak *et al.*, 1996) (*Harp Research Group*) usaram 6g de ácidos graxos ômega 3 por dia em 59 pacientes e não observaram alteração no curso da aterosclerose nesses pacientes. Outro estudo, o SCIMO (Schacky *et al.*, 1999) (*Study on Prevention of Coronary*

Atherosclerosis by Intervention with Marine Omega-3 Fatty Acids), mostrou resultados semelhantes com ingestão de 1,5 g/dia de ácidos graxos ômega 3.

Com relação à ocorrência de sangramento, não foi observado neste estudo; e hematúria não foi estatisticamente significativa nos dois grupos.

Para a avaliação da agregação plaquetária, utilizamos a plataforma do *Multiplate* por ser disponível no Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia.

Com relação à função plaquetária (*ASPIteste* e *TRAPtest*), não houve diferença. Estatisticamente significativa entre o grupo AAS 200 e 1g ômega 3 mais 100mg de AAS e a produção de tromboxane B2. Os valores do *TRAPtest* estavam dentro da faixa esperada (84-128), mostrando que a função plaquetária está preservada nestes pacientes.

Outros métodos para se avaliar a função plaquetária e a resposta ao ácido acetilsalicílico são descritos na literatura e não há no presente um consenso. O método clássico estabelecido para medir a agregação plaquetária é o agregômetro por transmissão de luz (LTA - LIGHT transmission aggregometry), porém consome muito tempo e é laborioso. O *Verify-Now* é um outro sistema baseado na retenção da agregação plaquetária usando turbidimetria ótica em um sistema contendo microcápsulas revestidas por fibrinogênio, sendo altamente reprodutível, mas de alto custo; contudo LTA mostrou baixa sensibilidade e boa especificidade quando comparado ao *Verify-Now*.

Neste estudo, não houve correlação entre os resultados do *ASPIteste* e a concentração plasmática de tromboxane B2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento com relação à função plaquetária e com relação à produção de tromboxane B2.

Na análise dos testes de função plaquetária e concentração plasmática de tromboxane B2, entre os pacientes classificados como respondedores e não respondedores ao AAS, este estudo mostra que houve redução dos valores de *ASPIteste* mais significativa no grupo não respondedor do que o outro grupo respondedor. Porém, este estudo não mostra se foi o grupo AAS 200 ou grupo ômega 3 de 1g mais AAS 100mg que causou esta queda: será motivo de futura pesquisa na sequência deste estudo. Com relação à análise separadamente entre o grupo

respondedor e não respondedor, este estudo mostrou uma correlação entre os resultados do teste de função plaquetária e produção de tromboxane B2 no grupo de respondedores. Tal observação concorda com a literatura a respeito: Kidson-Gerber *et al.* (2010) mostram que os níveis de tromboxane B2 podem ser utilizados para medir o efeito da ação do ácido acetilsalicílico nas plaquetas, constituindo um método de acesso direto e tecnicamente fácil de executar, com boa especificidade; medindo a capacidade da plaqueta produzir tromboxane A2 e, consequentemente, medir diretamente o efeito do AAS (Kidson-Gerber *et al.*, 2010). Discutindo em termos de não resposta ao ácido acetilsalicílico, isso não deveria ser limitado por situações quando o AAS é incapaz de inibir a COX-1 tromboxane-dependente (efeito farmacológico).

A falha no tratamento deveria descrever os eventos que ocorrem sob o uso do AAS ou quando houver inibição inadequada da ativação plaquetária.

Portanto, testes específicos para o efeito do AAS como os níveis de tromboxane B2 são mais bem colocados para diferenciar nos não respondedores se há ação farmacológica insuficiente do AAS ou se há outras causas. Nos pacientes respondedores ao AAS nos testes de tromboxane B2 e nas plataformas que medem a agregação plaquetária (agregômetros), provavelmente, tem ambos: incapacidade do AAS em inibir a produção de tromboxane A2 dependente e uma capacidade inata de elevada reatividade plaquetária. Tal comportamento causa uma redução do AAS em prevenir eventos cardiovasculares. Na prática clínica, é útil lançar mão de ambos os testes: um teste que mede o efeito farmacológico do AAS (nível sérico de tromboxane B2) e um teste de função plaquetária (Multiplate). A mensuração dos níveis de tromboxane B2 sérico é de fácil execução, não depende de perícia técnica do operador e é de custo acessível aos laboratórios.

Estratificando os grupos entre respondedores e não respondedores por grupos de tratamento, este estudo mostrou que, embora o efeito do tratamento não tenha sido estatisticamente diferente entre os grupos, houve, no grupo que usou o AAS 200mg por 30 dias e classificação como não respondedor, uma queda dos valores do Aspitest (< 40), reclassificando-os como respondedores. Isso não ocorreu com o grupo ômega 3 mais 1g AAS 100mg.

Com relação ao efeito do tratamento sobre respondedores e não respondedores separadamente, este estudo mostrou que apenas no grupo dos não respondedores houve redução significativa dos valores de *ASPIteste*, foram apenas no grupo AAS 200 que os níveis de *ASPIteste* caíram para < 40 : respondedores.

Este estudo utilizou baixas doses de AAS, o que está em conformidade com a literatura: as doses variam de 50 – 100 – 325 – 1000mg (Gurbel *et al.*, 2007; Papathanasiou *et al.*, 2009; Rocca & Petrucci, 2012).

Este estudo mostrou que a presença do alelo raro do polimorfismo rs 3842787 do gene PTGS 1 – (COX-1) está associada com uma pior resposta do *ASPIteste* (não respondedor), enquanto que pacientes portadores do alelo raro do polimorfismo rs 5918 no gene ITGB 3 (GPIIIa) apresentam pior resposta com relação à concentração de tromboxane B2 após trinta dias de tratamento.

Polimorfismos genéticos podem impactar na análise da variação interindividual de resposta ao AAS. Uma variedade de genes candidatos tem sido sugerida.

Goodman *et al.* (2008) analisaram 31 estudos nos quais 50 polimorfismos em 11 genes foram investigados em 2.834 pacientes. O polimorfismo relacionado ao receptor plaquetário GPIIIa (rs 5918) gene ITGB3 e o polimorfismo mais frequentemente investigado e associado à resistência ao AAS (Calvete, 1995; Ginsberg, 1997). Com relação aos polimorfismos da COX-1 (A 842G/C50T), não houve associação com a resistência ao AAS (rs 3842787).

Os polimorfismos mostrados neste estudo rs 3842787 ao gene PTGS1 que codifica a COX-1 e rs 5918 do gene ITGB3 que codifica o receptor plaquetário GPIIIa relacionados aos não respondedores estão de acordo com a literatura. Em um estudo com indivíduos saudáveis, Halushka *et al.* (2003) mostraram forte inibição da síntese da prostaglandina H_2 .

Em portadores do SNP rs 384287 comparados com indivíduos homozigotos para alelos selvagens, Maree *et al.* (2005) genotiparam 144 pacientes com doença arterial coronária e, dos cinco polimorfismos estudados, mostraram modulação importante do efeito antiplaquetário do AAS na variante C50T (rs 3842787). Observações similares foram realizadas por Lepantalo *et al.* (2006). Entretanto Macchi *et al.* (2003) foram pioneiros na avaliação da resposta ao AAS de acordo com o genótipo C807-gene GIIa. Su *et al.* (2007) mostraram que o alelo 807T(GPIIIa) – rs5918 confere 3,8 vezes mais resistência comparados com 807 homozigotos em 200 pacientes com aterosclerose em uma população chinesa.

A resistência ao AAS analisada pelas variantes genéticas segue o princípio que o fenótipo é determinado pelo genótipo e os polimorfismos variam de acordo com a etnia. Wagner *et al.* (1996) mostraram maior resistência ao AAS para os europeus com rs 3842787 e para o rs 3842792 para os africanos. Na população chinesa, o polimorfismo do gene GPIIIa (ITGB3) rs 5918 tem forte correlação com a resistência ao AAS.

O rs 5918 (ITGB3): troca de T>C tem moderada evidência para seus portadores com resistência ao AAS (Wang *et al.*, 2014).

Portadores do SNP rs 12041331 para o gene PEARS 1 também demonstraram resistência ao AAS nos estudos mais recentes (Lewis *et al.*, 2013).

15 LIMITAÇÕES

Este estudo apresenta algumas limitações importantes por ser um estudo experimental e com amostra relativamente pequena. Os pacientes receberam a dose de 1 grama de ácido graxo Ômega 3, enquanto a literatura varia de 1 até 4 gramas por dia; a posologia de 1g/dia foi considerada a mais adequada devido a características como paladar, hálito de peixe, flatulência e tamanho dos comprimidos de difícil deglutição, fatores pouco tolerados pelos participantes da pesquisa. Outro ponto a ser considerado é a análise *in vitro* da agregação plaquetária. Não foi objeto deste estudo a avaliação de pacientes diabéticos (Fateh-Moghadam *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2009) (aumento da atividade tromboxane B2). Não realizamos a dosagem urinária do 11 di-hidroxi-tromboxane B2 pelo alto custo dos insumos.

O acompanhamento da aderência às medicações deste estudo foi realizado no momento da avaliação clínica e por telefone.

16 IMPLICAÇÕES

A farmacogenética (farmacogenômica) busca a terapia adequada para assegurar a eficácia e prevenir a toxicidade de fármacos com base no perfil genético do indivíduo (*“the right drug, for the right patient, with the right dose”*) (Ahmad, 2011), sendo uma ferramenta adicional para o clínico visando à maior eficácia e segurança no tratamento farmacológico. Aplicaram-se estes conceitos no presente trabalho, analisando a agregação plaquetária e os polimorfismos relacionados ao AAS e Ômega 3.

O termo não respondedor ao ácido acetilsalicílico (resistência) (Hankey *et al.*, 2006; Krasopoulos *et al.*, 2007; Rafferty *et al.*, 2010) é controverso e sua prevalência varia de 5 a 60%, dependendo da metodologia usada e da população estudada. Tecnicamente a resistência é um fenômeno laboratorial e se refere à inabilidade do ácido salicílico em inibir a função plaquetária em um ou mais testes laboratoriais. Muitos procedimentos laboratoriais estão disponíveis para avaliar vários aspectos dos efeitos *ex vivo* do ácido acetilsalicílico na função plaquetária: vários tipos de agregômetros (LTA, Verify Now, PFA-100) Multiplate e, também, a mensuração dos níveis de tromboxane B2, bem como, a forma inativa e estável do tromboxane A2: níveis urinários de 11-dehydro-tromboxane B2, não utilizada neste estudo.

- Fatores ambientais (Epigenética), como sexo, obesidade, tabagismo, interações entre fármacos (AINH) (Kantor, 1979; MacDonald & Wei, 2003), por exemplo, e condições associadas com aumento da atividade plaquetária, tais como: exercício, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica e doenças agudas podem modificar a ação inibidora do AAS nas plaquetas.
- A baixa aderência do AAS pode ser uma causa importante na resistência ao AAS.

- Grande parte das pesquisas estudou o gene PTGS1 (COX-1), porque as enzimas COX são as moléculas-alvo da acetilação do AAS. No entanto, resultados dos estudos entre SNPs do PTGS1 e resistência ao AAS têm sido inconsistentes (Halushka *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2013).
- Os dados mais robustos na literatura sugerem os polimorfismos do gene ITGB3 (GPIIIa); a não resposta ao AAS.

Chasman *et al.* mostraram que um *SNP* relacionado aos níveis plasmáticos de lipoproteína *a* causam maior benefício do AAS nesses pacientes. Estudos como esse podem levar a um perfil genético personalizado que mais acuradamente identifica quais pacientes irão se beneficiar mais com o uso do ácido acetilsalicílico (LeBlanc *et al.*, 2015).

17 CONCLUSÕES

Utilizando como forma de acesso à função plaquetária o Multiplate, classificando os pacientes em respondedores e não respondedores.

- 1- Não houve melhora dos não respondedores a resposta da agregação plaquetária com a adição de ácido graxo Ômega 3 1000mg/dia ao AAS na dose de 100mg/dia.
- 2- Nos pacientes não respondedores que fizeram uso do AAS 200mg/dia por 30 dias houve queda do valor do *Aspitest* e passaram a ser considerados respondedores.
- 3- A presença dos alelos rs 384787 (COX1-PTGS1) na pior resposta ao *Aspitest* e do alelo rs 5918 na pior resposta a troboxane B₂ indica a não resposta ao ácido acetilsalicílico.
- 4- A farmacogenética pode ser utilizada como ferramenta auxiliar para o clínico, possibilitando um tratamento personalizado para o paciente com a escolha de doses maiores de ácido acetilsalicílico e evitando efeitos indesejáveis das doses maiores.

18 SEQUÊNCIA

As novas tecnologias genômicas permitem analisar grande número de polimorfismos genéticos simultaneamente como as utilizadas nos estudos de associação de genoma completo (GWAS) para avaliar sua relação com a resposta farmacológica. As consequências potenciais de polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo de fármacos incluem: resposta exacerbada ou falha terapêutica, toxicidade e reações adversas, necessidade de ajuste de dose eficaz, reduzida adesão, exacerbção de interações medicamentosas, falha na ativação de pró-fármacos e metabolismo alternativo com geração de metabólitos deletérios. Soma-se, ainda, a avaliação dos efeitos de polimorfismos sobre a expressão gênica na presença da terapia farmacológica. Neste cenário, os testes farmacogenéticos são uma estratégia oportuna para a seleção de novos fármacos, em estudos pré-clínicos e clínicos, com o objetivo de adequar eficácia, segurança e menor variabilidade possível na resposta individual baseados nos fenótipos populacionais, podendo estabelecer, assim, a dose resposta para cada posição geográfica e/ou étnica. Propõe-se, então, por meio da Medicina Translacional (personalizada), um instrumento complementar para o clínico visando à maior eficácia e segurança do tratamento farmacológico dos seus pacientes.

Outros polimorfismos têm sido associados à variabilidade de resposta ao ácido acetilsalicílico, nos genes: GPIBA, GP6, F2R, VAV3 e o polimorfismo intrônico rs12041331 no gene do receptor 1 de agregação endotelial plaquetária (PEAR1) com maior conteúdo desta proteína nas plaquetas e resposta aumentada ao ácido acetilsalicílico.

19 ANEXOS

19.1 ANEXO A – Multiplate mostrando os tipos de registro de curva do ASPIteste e TRAPteste

The temperature of the measurement block: 36.5°C, within specified range

05. Jun. 2

F1: Auto Pipette F2: Start timer F3: Start test F4: Enter ID F5: Change ID T: Select test F6: Print F7: Clear channel F8: Screen shot

Patient ID :	Patient ID :	Patient ID :	Patient ID :	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4	Channel
AAS2-ALM-800176-05062013	AAS2-ALM-800176-05062013	AAS2-ALM-800176-05062013	AAS2-ALM-800176-05062013					
Test name : ASPIteste (Hirudin blood), V1	Test name : ADPIteste (Hirudin blood), V1	Test name : TRAPteste (Hirudin blood), V1	Test name : TRAPteste (Hirudin blood), V1					
Start : / Runtime : 05. Jun. 2013, 10:15 / 6'00"	Start : / Runtime : 05. Jun. 2013, 10:03 / 6'00"	Start : / Runtime : 05. Jun. 2013, 10:03 / 6'00"	Start : / Runtime : 05. Jun. 2013, 10:03 / 6'00"					
Area under the curve : 100 U	Area under the curve : 117 U	Area under the curve : 155 U	Area under the curve : 155 U					
Aggregation : RUC: 208.5 AU	Aggregation : RUC: 224.6 AU	Aggregation : RUC: 271.9 AU	Aggregation : RUC: 271.9 AU					
Velocity : RUC: 20.3 AU/min.	Velocity : RUC: 21.9 AU/min.	Velocity : RUC: 32.5 AU/min.	Velocity : RUC: 32.5 AU/min.					
CC=1.000, DIF=0.050%	CC=0.999, DIF=6.894%	CC=1.000, DIF=5.602%	CC=1.000, DIF=5.602%

19.2 ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética Médica

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

DATA DA ENTRADA: 09 de setembro de 2013.
DATA DA 1ª AVALIAÇÃO: 17 de setembro de 2013.
DATA DA AVALIAÇÃO FINAL: 01 de outubro de 2013.
CAAE: 22534113.0.0000.5462
Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4369
(este nº deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)
Investigadora Principal: Monica Maria Cartocci
Orientador: Prof. Dr. Dikran Armaganijian
Colaboradores: Prof. Dr. Marcelo Sampaio/ Profª. Dra. Paula Helena Ortiz/ Prof. Dr. Mario Hirata
Nº de Sujeitos no Centro: 210
Nº Total de Sujeitos: 210
Área de Conhecimento: Ciências da Saúde
Área Temática Especial: Não se aplica
Unitermos: Avaliação Farmacogenética da Aspirina
Fase: Não se aplica
Duração do Estudo: 08 meses
Apoio/ Patrocinador: FAPESP
Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
CEP Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Projeto de Pesquisa Clínica/ Tese de Doutorado: "Avaliação Farmacogenética da Aspirina em uso isolado e associada ao Ômega 3 em pacientes portadores de doença arterial coronária crônica".

Considerações/Comentários: O estudo tem como objetivo a avaliação farmacogenética da aspirina em indivíduos portadores de doença arterial coronária crônica.

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

- O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, 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.

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 • Fone: (11) 5085 6040 • E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

FORM 001IDPC Mar/09 rev.1

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

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

- Protocolo de Pesquisa Clínica/ Tese de doutorado – Aprovado
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado
- Declarações da pesquisadora: Cronograma do estudo/ Orçamento Financeiro Detalhado/ Declaração de realização do estudo (Dra. Maria Isabel Del Monaco e Dra. Paula Helena Ortiz)/ Declaração de riscos/ Declaração de publicação dos resultados/ Publicação dos resultados/ Declaração de responsabilidade, direitos e obrigações/ Forma de recrutamento/ Declaração currículo na Plataforma Lattes – Entregue
- Carta de submissão ao CEP – Entregue
- Folha de rosto – 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.

Situação: Protocolo Avaliado e Aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em reunião ordinária realizada no dia 01 de outubro de 2013.

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

São Paulo, 01 de outubro de 2013.

Pedro Silvio Farsky
Dr. Pedro Silvio Farsky
Coordenador do CEP
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

19.3 ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA Comitê de Ética em Pesquisa
---	--	---

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Submissão do Estudo – AVALIAÇÃO FARMACOGENÉTICA DA ASPIRINA EM USO ISOLADO E ASSOCIADA AO ÔMEGA 3 EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA CRÔNICA

CENTRO: INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
INVESTIGADOR: MÔNICA MARIA CARTOCCI
NÚMERO DO PACIENTE: _____
INICIAIS DO PACIENTE: _____

Prezado(a) Paciente,

Você está sendo convidado (a) para participar desta pesquisa acima citada que estou desenvolvendo com a Equipe de Médicos da Seção de Coronária que estão fazendo seu atendimento no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Este estudo visa identificar os não respondedores a aspirina e sugerir a necessidade de doses mais elevadas das mesmas, essa mudança de pessoa para pessoa pode estar relacionada com alterações genéticas e a presença de múltiplos fatores de risco responsáveis pela doença arterial coronária. A participação nesse estudo é voluntária, e caso queira participar do estudo precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Além de você, outros pacientes também participarão do estudo. Precisarei, ainda, que você responda

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 • Fone: (11) 5085 6040 • E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

FORM 001IDPC Mar/09 rev.1

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas de sua família, hábitos alimentares e uso de medicamentos. Será solicitado que você compareça em um dia agendado pela equipe para realizar uma entrevista clínica, exame físico e exames laboratoriais (em jejum), e será mantido o uso da aspirina na posologia utilizada comumente na prática clínica (100 mg/dia), e a dose será ajustada para duas tomadas de 100mg em intervalos de 12 horas associada ao ácido ômega 3 na dose de 1000mg/dia. Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação. Caso seja de seu interesse também disponibilizarei os resultados dos testes genéticos no final da pesquisa. Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode retirar-se a qualquer momento do estudo, sem penalidades ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia não será afetado. Se você aceitar participar deste estudo todos os seus registros médicos serão verificados pela equipe de pesquisa em busca de dados para o estudo. Assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) você está dando permissão para que isso seja feito. Sua identidade será mantida em segredo quando os resultados do estudo forem publicados. As informações coletadas durante o estudo serão armazenadas em um computador, mas seu nome não. Seu médico será informado de sua participação neste estudo. Por quaisquer motivos adequados, independentes de seu consentimento os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação nesse estudo. O motivo lhe será explicado e poderá ser devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outras complicações. Caso você apresente uma reação adversa (efeito colateral): dor de estômago, dor de cabeça, sangramento durante o estudo você deve entrar em contato imediatamente com o investigador Clínico, Doutora Mônica Maria Cartocci telefone: 99919-9184 ou 5531-0586 que irá responder todas as dúvidas que você possa ter sobre sua participação nesse estudo. Em caso de

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

emergência clínica procurar o setor de pronto atendimento do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

Li e compreendi este termo de consentimento e todas as minhas dúvidas foram resolvidas. Recebi explicações sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos de estudo a que serei submetido e os possíveis riscos e desconfortos e os benefícios que posso apresentar. As alternativas à minha participação neste estudo também foram discutidas. Portanto, concordo voluntariamente em fornecer meu consentimento para participar deste estudo clínico.

_____: ____ h
Assinatura do Paciente Data Hora

_____: ____ h
Testemunha (se necessário) Data Hora

_____: ____ h
Mônica Maria Cartocci Data Hora

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

patologias obstrutivas do segmento cavo-iliaco, em pacientes portadores de insuficiência venosa crônica avançada (CEAP C3-6), considerando a ultrassonografia intravascular como padrão ouro para esse diagnóstico.

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 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.

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

- Protocolo de Estudo Clínico/ Tese de Doutorado – Aprovado
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado com Recomendação
 - 1) Incluir no TCLE o contato telefônico do investigador e do CEP.
- Declaração de Orientação e Co-orientação - Entregue
- Carta de Submissão ao CEP – Entregue
- Declaração de Realização do Estudo: Dr. Jorge Eduardo Assef; Dr. Nilo Mitsuru Izukawa; Dr. Antonio Massamitsu Kambara – Entregue

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

63
Rc

- Declarações do Pesquisador: Forma de Recrutamento; Declaração de Propriedade das Informações; Declaração de Manuseio de Material Biológico; Publicação dos Resultados da Pesquisa; Declaração de Responsabilidade, Direitos e Obrigações; Justificativa para Orçamento Financeiro; Termo de Compromisso do Investigador; Lista de Centros Participantes; Declaração de Riscos e Benefícios; Declaração de Confidencialidade; Declaração de Compromisso de Notificação de EAS ao CEP; Declaração sobre Currículo Lattes – Entregue
- Currículo do Pesquisador – Entregue
- Folha de Rosto – 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.

Situação: Protocolo Avaliado e Aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em Reunião Ordinária Realizada no Dia 16 de Outubro de 2012.

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

Pedro Silvio Farsky

Dr. Pedro Silvio Farsky
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

São Paulo, 16 de outubro de 2012.

19.4 ANEXO D - Protocolo dos Exames Laboratoriais e Instruções para Coleta

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Coordenadoria de Serviços de Saúde

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

PROTOCOLO: " AVALIAÇÃO FARMACOGENÉTICA DO ACIDO ACETIL SALICILICO EM USO ISOLADO OU ASSOCIADO AOS ACIDOS GRAXOS OMEGA 3 EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA CRONICA"

RESPONSÁVEL PELO PROJETO: Dr. Dikran Armaganejan e Dra. Monica Maria Cartocci

AAS 2

Nome do paciente: _____

Registro Hospitalar: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

R.G. _____ Data da coleta: ____/____/____

GLICEMIA EM JEJUM	HEMOGRAMA	DIMERO D
TGO	COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES	ACIDO ÚRICO
TGP	TRIGLICERIDES	URÉIA
CREATININA	SÓDIO	PCR US
POTÁSSIO	TROPONINA	CPK
CKMB	CKMB massa	TP
FRIBRINOGENIO	TTPA	URINA I

Nome do Médico Solicitante: _____ CRM _____

Dra. Mônica Maria Cartocci

Instruções para coleta: CARDIOLOGIA - TERAPIA INTENSIVA

CREMESP 58.888

COLETAR: 05 TUBOS COM EDTA; 03 TUBOS SECOS COM GEL; 2 TUBOS DE CITRATO DE SÓDIO; 01 TUBO COM HIRIDINA; 01 FRASCO URINA I

Identificar os tubos

CADASTRAR: AAS 1; AAS 2

SEPARAR PARA BIOLOGIA MOLECULAR: 04 TUBOS DE EDTA E 01 TUBO SECOS COM GEL E 01 TUBO COM HIRIDINA Avisar a Biologia Molecular para a retirada das amostras

Coletado por: _____ Hora: _____ mod. 96

19.5 ANEXO E - Orientações Médicas para o Paciente Ômega 3

Orientações Médicas para o Paciente.

AAS2

Dra. Mônica (LIMC)

Ômega 3:

Além de tomar a Aspirina 100mg/dia, tomar 02
capsulas de Ômega rigorosamente por 30 dias.

*Não ingerir mais peixe na dieta que o habitual

Em caso de sangramento ou dispepsia ligar para
Dra. Mônica:

11 (9) 9919-9184

11 5085-6086

Data de Retorno: ____/____/____.

Nome: _____

RG: _____

Dra. Mônica Maria Cartocci
CARDIOLOGIA - TERAPIA INTENSIVA
CREMESP 58.888

19.6 ANEXO F- Orientações Médicas para o Paciente AAS 200

Orientações Médicas para o Paciente.

AAS2

Dra. Mônica (LIMC)

Aspirina:

Aspirina 200mg/dia.

Tomar 02 comprimidos por dia de Aspirina
100mg rigorosamente por 30 dias.Em caso de sangramento ou dispepsia ligar para
Dra. Mônica:

11 (9) 9919-9184

11 5085-6086

Data de Retorno: ____/____/____.**Nome:** _____**RG:** _____*Dra. Mônica Maria Cartocci*
CARDIOLOGIA - TERAPIA INTENSIVA
CREMESP 58.888

19.7 ANEXO G- Questionário Clínico (Versão 2.0) : Projeto de Pesquisa: AAS 2 - "Avaliação farmacogenética da aspirina em pacientes portadores de doença arterial coronária crônica" (Nº CEP: 4369)

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia

Projeto de Pesquisa: AAS2 - "Avaliação farmacogenética da aspirina em pacientes portadores de doença arterial coronária crônica" (Nº CEP: 4369)

Responsável: Dr. Mônica Maria Cartocci

Questionário Clínico Versão 2.0

A AAS 100 ____/____/____ (Entrevista)

B ____/____/____

C ____/____/____

Dr. Mônica Maria Cartocci
CARDIOLOGIA - TERAPIA INTENSIVA
CREMESP 58.988

Número do paciente no Projeto: ____ Iniciais: ____

Nome do Paciente: _____

Registro no IDPC: ____ Naturalidade: ____ RG: ____

Gênero: Masculino () Feminino () Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____

Raça: Branca () Parda () Negra () Asiática () Outro () ____

Endereço Residencial: _____

Bairro: ____ Cidade: ____ Estado: ____ CEP: ____-____

Telefones: () ____ () ____

Horários para contato: ____ E-mail: ____

Escolaridade: Ensino Fundamental () Ensino Médio () Ensino Superior () Pós-graduação ()

Profissão: ____ Ocupação: ____

Empregado: () Sim () Não Estado Civil: ____ Número Filhos: ____

Antecedentes PESSOAIS

Hipertensão arterial: Não () Sim () Obesidade: Não () Sim ()

Dislipidemia: Não () Sim () Transfusão Sang. prévia: Não () Sim ()

Diabetes: Não () Sim ()

Doença Arterial Coronariana: Não () Sim () Quando? ____

Acidente Vascular Cerebral: Não () Sim () Quando? ____

Acidente Isquêmica Transitório: Não () Sim () Quando? ____

Doença Arterial Periférica: Não () Sim () Quando? ____

Infarto Agudo do Miocárdio: Não () Sim () Quando? ____

Insuficiência cardíaca: Não () Sim () Classe Funcional NYHA: I () II () III () IV ()

Usa Marca-passo: Não () Sim () Data do Implante: ____/____/____ Tipo: ____

CDI: Não () Sim () Data do Implante: ____/____/____ Motivo: ____

Arritmia: Não () Sim () Tipo: ____ Quando? ____

Alergias: Frutos do Mar/ Peixe: Não () Sim ()

Medicamentos: Não () Sim () Quais? ____

Revascularização do Miocárdio: Não () Sim () Quando? ____

Angioplastia Transluminal Coronária: Não () Sim () Quando? ____

Remanescente de Morte Súbita: Não () Sim () Quando? ____

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia

Outras doenças: _____

W
Dra. Mônica Maria Cartocci
 CARDIOLOGIA - TERAPIA INTENSIVA
 CREMESP 58.888

Hábitos e Vícios

Atividade Física: Não () Sim () Periodicidade: _____ x semana. Tipo: _____

Drogas Ilícitas: Não () Sim () Tipo de droga: _____

Usou no passado: Não () Sim ()

Tabagismo: Não [nunca fumou] () Sim [fuma atual] () Nº cigarros/dia: _____

Ex-tabagista () Fumou últimos seis meses: Não () Sim ()

Etilismo: Não () Sim () Até 7 doses/semana () Mais de 7 dose/semana ()

Tipo de bebida: Vinho () Destilados () Cerveja ()

Ex-etilista: Não () Sim ()

Sintomas

Dispnéia: Não () Sim () Classe Funcional NYHA: I () II () III () IV ()

Angina: Não () Sim () Classe Funcional CCS: 1 () 2 () 3 () 4 ()

Tonturas: Não () Sim ()

Síncope: Não () Sim ()

Sintomas digestivos: Não () Sim () Tipo: _____

Palpitações Taquicárdicas: Não () Sim ()

Edema de membros inferiores: Não () Sim ()

Antecedentes FAMILIARES

Hipertensão arterial: Não () Sim () Parentesco: _____ Idade: _____

AVC: Não () Sim () Parentesco: _____ Idade: _____

DAC: Não () Sim () Parentesco: _____ Idade: _____

Diabetes: Não () Sim () Parentesco: _____ Idade: _____

Dislipidemia: Não () Sim () Parentesco: _____ Idade: _____

Obesidade: Não () Sim () Parentesco: _____ Idade: _____

Morte súbita: Não () Sim () Parentesco: _____ Idade: _____

Doença psiquiátrica: Não () Sim () Parentesco: _____ Idade: _____

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
 Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia

Exame Clínico

Peso: _____ Altura: _____ Circ. Abdom. : _____ IMC: _____
 Mucosas: Coradas () Descorada () Cianose ()
 Edema de MMII: Não () Sim ()
 Ritmo Cardíaco: _____
 Pressão Arterial (mmHg): PAS _____ PAD _____
 FC: _____
 Sopro: Não () Sim () _____
 Sopro carótidas: Não () Sim () _____
 Pulmões: Limpos () Estertores () _____
 Observações: _____

Dra. Mônica Maria Cartocci
 CARDIOLOGIA - TERAPIA INTENSIVA
 CREMESP 58.888

Exames Laboratoriais:

Utiliza Medicamentos? (X) Sim () Não

1. Aspirina (AAS) 100 (X) mg Posologia _____
2. _____ () mg () mcg / Posologia _____
3. _____ () mg () mcg / Posologia _____
4. _____ () mg () mcg / Posologia _____
5. _____ () mg () mcg / Posologia _____
6. _____ () mg () mcg / Posologia _____
7. _____ () mg () mcg / Posologia _____
8. _____ () mg () mcg / Posologia _____
9. _____ () mg () mcg / Posologia _____
10. _____ () mg () mcg / Posologia _____
11. _____ () mg () mcg / Posologia _____
12. _____ () mg () mcg / Posologia _____

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia

Observações/Eventos:

W
Dra. Mônica Maria Cartocci
CARDIOLOGIA - TERAPIA INTENSIVA
CREMESP 58.888

Tempo A

W

Tempo B

Tempo C

19.8 ANEXO H - Multiplate mostrando os tipos de registro de curva do ASPItest e TRAPtest - G

(9.000) acompanhado 28/09/2015 - LMC

EXTRAÇÃO MANUAL DE DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	CAP 01
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA		Rev. 1	Pág. 1/4

Elaborado por: Adriana Regina Garofalo e Thiago D. C. Hirata Data: 28/09/2012	Visto: Revisado e aprovado por: Adriana Regina Garófalo Data: 25/06/2015
--	--

Data	Revisão	Descrição da revisão

Setor: Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia – Sala de DNA	Profissionais envolvidos: Colaboradores do Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia
--	--

Objetivo: Extração manual de DNA de sangue periférico total.

EXTRAÇÃO DE DNA NO SANGUE TOTAL (QIAamp DNA Blood Mini Kit)

Preparo pré-experimental:

- 1) Ligar o **Termo-bloco** e ajustá-lo para **56°C** a ser utilizado na etapa 4.
- 2) Deixar as amostras de sangue total periférico homogeneizando à temperatura ambiente (15-25°C) por 15 min.
- 3) Assegurar que **Buffer AW 1**, **Buffer AW2** e **Qiagen Protease** foram preparados.
- 4) Deixar o **Buffer AE** à temperatura ambiente para eluição na etapa 10.
- 5) Verificar os materiais a serem utilizados: Kit, tubos, ponteiros, estantes e centrífuga.
- 6) Limpar o ambiente que será utilizado.
- 7) Sempre realizar a extração de DNA em triplicata.
- 8) Nomear 1 tubo de 1,5 mL para cada amostra com os dados do paciente.

EXTRAÇÃO MANUAL DE DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	CAP 01	
	INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA	Rev. 1	Pág. 2/4

Descrição do processo:

- 1) Para cada amostra (replica também) separar: 2 tubos 1,5 mL (1 para extração e 1 nomeado para guardar o DNA), 4 tubos sem tampa de 2 mL.
- 2) Pipetar **20 µL** da Protease QIAGEN (proteinase K) dentro dos tubos Eppendorf de 1,5 mL previamente numerados.
- 3) Adicionar **200 µL** de **sangue total** homogeneizado no tubo Eppendorf contendo a protease.
- 4) Adicionar **200 µL** de tampão **Buffer AL**, e misturar no vórtex por 15 segundos. *2-10 min* *CSA 200 µL de Buffer AL*
- 5) Incubar a **56°C** por **10 min**.
- 6) Montar e numerar as **colunas spin** QIAGEN que serão utilizados no item 8.
- 7) Centrifugar os tubos rapidamente na mini-centrífuga somente para remover líquido da tampa do tubo (cerca de 10 segundos).
- 8) Adicionar **200 µL** de **Etanol 96-100%** na amostra e misturar pelo vórtex por 15 seg. Após a mistura, centrifugar os tubos rapidamente na mini-centrífuga somente para remover líquido da tampa do tubo (cerca de 10 segundos).
- 9) Cuidadosamente aplicar a mistura da etapa 6 e 7 na coluna QIAGEN (em tubo coletor PT de 2 mL, sem tampa) sem esparramar fechando a tampa e centrifugar a **8000 rpm** por **1 min**. Colocar a coluna QIAGEN no tubo de 2 mL (kit) limpo e descartar o tubo contendo o filtrado.
- 10) Cuidadosamente abrir a coluna spin QIAGEN e adicionar **500 µL** do **tampão AW1** *(claro)* sem molhar as laterais. Fechar a tampa e centrifugar a **8000 rpm** por **1 min**. Colocar a coluna spin QIAGEN no tubo PT de 2 mL (kit) limpo e descartar o tubo contendo o filtrado.
- 11) Adicionar **500 µL** de tampão **AW2** *(claro)* sem encostar ponteira no frasco do reagente. Fechar a tampa e centrifugar na velocidade máxima **14.000 rpm (13.000 rpm)** por **3 min**. *(não se deve tocar no tubo p/ não contaminar o DNA)*
- 12) Colocar a coluna spin QIAGEN no tubo de 2 mL (kit) limpo e centrifugar na velocidade máxima **14.000 rpm (13.000 rpm)** por **3 min**. para secar a coluna.
- 13) Colocar a **coluna spin** QIAGEN em um tubo Eppendorf 1,5 mL previamente identificado. Ou Colocar mais um tubo de 2 mL (para depois de eluir e centrifugar transferir para um tubo de 1,5 mL identificado com tampa). *(com o DNA)*
- 14) Cuidadosamente abrir a coluna e adicionar **100 µL** do **Buffer AE** bem no centro da coluna evitando encostar no filtro. *ELUIR O DNA (solução de eluição)*
- 15) Incubar à temperatura ambiente **15-25°C** por **3 ou 10 min**. (Verificar tempo de eluição)

EXTRAÇÃO MANUAL DE DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	CAP 01
	INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA	Rev. 1	Pág. 3/4	

- 16) Centrifugar a **8000 rpm** por **1 min.** *final = respl de DNA*
- 17) (Transferir o volume do tubo de 2 mL para o tubo de 1,5 mL identificado com tampa.)
- 18) Aliquotar em tubo 0,5 mL 5 uL para gel de agarose e 1 uL para quantificação por Qubit.
- 19) Limpar e organizar o ambiente utilizado. Desligar o banho-maria e centrífugas.

ANEXO 1: Esquematização das etapas realizadas no procedimento:

EXTRAÇÃO MANUAL DE DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit)

CAP 01

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

Rev. 1

Pág. 4/4

Extração Manual de DNA de sangue

QIAamp Spin Column Procedure in microfuges on vacuum manifolds

19.9 ANEXO I - Curvas de Genotipagem

ford Journals Science & Mathematics Nucleic Acids Research

oxfordjournals.org

Nucleic Acids Res March 15, 2004 vol 32 no 6 e55

ocked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and alidation using real-time PCR

owerPoint Slide for Teaching

ownloading may take up to 30 seconds. If the slide opens in your browser, select File -> Save As to save it.)

ck on image to view larger version.

Figure 2. Allele discrimination curves generated for the *Drosophila* 200M polymorphism. The y-axis represents the fluorescence intensity and the x-axis represents the cycle number.

FAM) satisfying the three proposed criteria. (B) Example of a true homozygote (CC) with the amplification curve of the JOE channel satisfying *Criteria A* and *B*. (C) Example of a true homozygote (TT) with the amplification of the other channel (FAM) satisfying *Criteria A* and *B*. (D) Example of an ambiguous heterozygote. *Criteria A* and *B* (allowing a 5% error) were not satisfied for the FAM fluorophore channel, and *Criterion C* was not met. Hence, a true homozygote (CC) is deduced. (E) Example of another (observational) ambiguous heterozygote. All three genotype criteria were not satisfied for both fluorophore channels (allowing a 5% error). Hence, this sample is excluded from genotypic and allelic association analyses.

Online ISSN 1362-4962 - Print ISSN 0305-1048

Copyright © 2015 Oxford University Press

[Site Map](#) [Privacy Policy](#) [Cookie Policy](#) [Legal Notices](#) [Frequently Asked Questions](#)

Oxford Index

About the Index

●●●●●●●● Show related links

Order Oxford University Press

Oxford University Press

19.10 ANEXO J - Protocolo para PCR

Protocolo para qPCR no Rotor-Gene TaqMan

Reagente: TaqManGTXpress Master Mix

Projeto: AAS2

Gene: PTGS1 rs3842787

Responsável pela execução: Eli

Data: 07/08/15

Amostras: 01, 02, 03, 05, 08, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 31

22A + 25 + 26 + 29 + 30 + 31

Componente	□ inicial	Volume/reação	□ final	Volume p/ xx (+sobras) reações
Água livre de RNase (H ₂ O depec)		8ul		80
TaqMan GTXpress Master Mix	2x	10ul	1x	100
TaqMan SNP Genotyping Assay	2x	1ul	1x	10
Amostra de DNA	10ng/ul	1ul		10
Volume Total		20ul		

Tempo de incubação (hold): 20 segundos a 95°C

Denaturação: 15 segundos a 95°C

Anelamento e extensão: 60 segundos por 60°C

Número de ciclos: 40

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AAS2 01	AAS2 02	AAS2 03	AAS2 05	AAS2 08	AAS2 10	AAS2 11	AAS2 12	AAS2 13	AAS2 16	AAS2 17	AAS2 19
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
AAS2 22	AAS2 23	AAS2 24	AAS2 25	AAS2 26	AAS2 29	AAS2 30	AAS2 31	AAS2 13	AAS2 25	AAS2 CN	AAS2 CN

20 REFERÊNCIAS

1. Adamns Jr HP, Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, et al. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke. a scientific statement from the stroke council of the American Stroke Association. *Stroke*. 2003;34(4):1056-83.
2. Ahmad T. The pharmacogenetics of antiplatelet agents: towards personalized therapy? *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:560-71.
3. Aijan R, Storey RF, Grant PJ. Aspirin resistance and diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2008;51(3):385-90.
4. Akay OM, Canturk Z, Akin E, Bal C, Gulbas Z. Aspirin-resistance frequency: a prospective study in 280 healthy Turkish volunteers. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2009;15(1):98-102.
5. Andraws R, Berer JS, Brown DL. Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta – analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 2005;293:2649.
6. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ*. 1994;308(6921):81-106.
7. Antitrombotic Trialists Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324(7329):71-86.
8. Aradi D, Storey RF, Komócsi A, Trenk D, Gulba D, Kiss RG, et al. Expert position paper on the role of platelet function testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2014; 35(4):209-15.
9. Armaganijan D, Timerman A. *Farmacologia cardiovascular – com suas aplicações terapêuticas*. São Paulo: Editora Atheneu; 2013.
10. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Antithrombotic Trialists Collaboration, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomized trials. *Lancet*. 2009;373(9678):1849-60.

11. Baigent C, Collins R, Appleby P, Parish S, Sleight P, Peto R.; ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. The ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *BMJ*. 1998;316(7141):1337-43
12. Batlouni M, Ramires JAF. *Farmacologia e terapêutica cardiovascular*. 2a. ed.; São Paulo: Atheneu, 1999.
13. Baumann KH, Hessel F, Larass I, Müller T, Angerer P, Kiefl R, von Schacky C. Dietary omega-3, omega-6, and omega-9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocytes. A randomized volunteer study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Jan;19(1):59-66.
14. Becker RC, Moliterno DJ, Jennings LK, Pieper PS, Pei J, Ziada KM, et al. Safety and tolerability of SCH 530 3548 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet*. 2009;373:919-28.
15. Bjornsson T, Schneider D, Berger H Jr. Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis. Fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;250(1):154-60.
16. Buchanan MR, Brister SJ. Individual variation in the effects of ASA on platelet function; implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol*. 1995;11(3):221-7.
17. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*. 1989;2(8666):757-61.
18. Calvete JJ. On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995;208:346-60.
19. Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ. Aspirin resistance and genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis*. 2002;14(1):51-8.
20. Cattaneo, M. Resistance to antiplatelet drugs: Molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost*. 2007;5(suppl1):230-7.
21. Chen P, Véricel E, Lagard M. Poxytins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. *FASEB J*. 2011;25(1):382-8.
22. Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med*. 2006;12:1075.

23. Croset M, Vericel E, Rigaud M, Hanss M, Courpron P, Dechavanne M, Lagarde M. Functions and tocopherol content of blood platelets from elderly people after low intake of purified eicosapentaenoic acid. *Thromb. Res.* 1990;57(1):1-12.
24. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007;357:2482-94
25. De Wood MA, Spores J, Notske R, Mouser LT, Burroughs R, Golden MS, et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl Med J.* 1971;325-31.
26. DeBette S, Ibrahim Verbaas CA, Bressler J, Schuur M, Smith A, Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium, et al. Genome-wide studies of verbal declarative memory in nondemented older people: the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology consortium. *Biol Psychiatry.* 2015;77(8):749-63.
27. Demers L, Budin R, Shaikh B. The effects of aspirin on megakaryocyte prostaglandin production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1980;163(1):24-9.
28. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation.* 2002;105(14):1650-5.
29. Ele K, Canção Y, Daviglus M, Liu K, Van Horn L, Dyer AR, et al. Accumulated evidence on first consumption and coronary heart disease mortality; a meta-analysis of cohort studies. *Circulation.* 2004;109:2705-11.
30. Engler M, Engler MB. Omega-3 fatty acids role in cardiovascular health and disease. *J Cardiovasc Nurs.* 2006;21(1):17-24.
31. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995;92(3):657-71.
32. Fan L, Cao J, Liu L, Li X, Hu G, Hu Y, Zhu B. Frequency, risk factors, prognosis, and genetic polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene for aspirin resistance in elderly Chinese patients with cardiovascular disease. *Gerontology.* 2013;59(2):122-31.
33. Fateh-Moghadam S, Plockinger U, Cabeza N, Htun P, Reuter T, Ersel S, et al. Prevalence of aspirin resistance with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2005; 42:99-103.

34. Finzi AA, Latini R, Barlera S, Rossi MG, Ruggeri A, Mezzani A, et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on malignant ventricular arrhythmias in patients with chronic heart failure and implantable cardioverter-defibrillators: A substudy of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Insufficienza Cardiaca (GISSI-HF) trial. *Am Heart J*. 2011 Feb;161(2):338-343.
35. Food and Drug Administration Nonprescription Drugs Advisory Committee. Briefing Information. Section III: NSAID/Aspirin reviews: Aspirin – GI Bleed. NSAID – GI Bleed September 19, 2002. Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3882b1.htm>; accessed january 28, 2003.
36. Forbes CD. European stroke prevention study 2: dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *Int J Clin Pract*. 1997 Jun;51(4):205-8.
37. Freemantle N, Cleland J, Young P, Mason J, Harrison J. Beta blockade after myocardial infarction: Systematic review and meta regression analysis. *BMJ*. 1999;318(7200):1730-7.
38. Freire C, Aisset T, Quilici J, Camoin L, Carvajal J, Morange PE, et al. ADP – induced platelet aggregation an platelet reactivity index VASP are good predictive markers for clinical outcomes in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2007;98(4):838-43.
39. Fuster V, Dyken ML, Vokonas PS. Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. *Circulation*. 1993;87:659-75.
40. Fuster V, Lewis A. Conner memorial lecture mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994;90(4):2126-46.
41. Gardemann A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, et al. Association of the platelet glycoprotein IIIa PLA1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thromb Haemost* 1998; 80(2):214-7.
42. Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996, 6(10):995-1001.
43. Ginsberg MH. Integrin alpha (IIb), beta (3) and platelet function. *Thromb Haemost*. 1997;78:96-110.
44. Goldman S, Copeland J, Moritz T, Henderson W, Zadina K, Ovitt T, et al. Improvement in early saphenous vein graft patency after coronary artery bypass surgery with antiplatelet therapy: results of a veterans administration cooperative study. *Circulation*. 1988;77(6):1324-32.

45. Goodman LS, Gilman A. *Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics* (9th ed) by Goodman, Louis Sanford published by Mcgraw-Hill (Tx) Hardcover Hardcover – January 30, 1996.
46. Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66(2):222-32.
47. Grove EL. Antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. *Dan Med J*. 2012; 59(9):B4506.
48. Gum PA, Kotte-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:961-5.
49. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, et al. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation*. 2007;115(25):3156-64.
50. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther*. 2003 Jan;73(1):122-30.
51. Hankey G J, Eikelboom JW. Aspirin resistance, *Lancet*, 2006;367:606-17.
52. Hansson GK, Libby P, Schombeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2002;91:281-91.
53. Harris K, Nguyen P, Van Cott EM. Platelet PIA2 polymorphism and the risk for thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(2):282-6.
54. Harris WS. Expert opinion: omega-3 fatty acids and bleeding-cause for concern? *Am J Cardiol*. 2007;99(6A):44C-46C.
55. Harvey W. *Exercitatio anatomica. de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1928. Leake C, Translator.
56. Hayden M, Pignone M, Phillips C, Mulrow C. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the V.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002;136:161-72.
57. Hecker G, Utz RJ, Kupferschmidt V. Low levels of hydrogen peroxide enhance platelet aggregation by cyclooxygenase activation. *Eicosanoids*. 1991;4(2):107-13.
58. Jámber C, Weber CF, Gerhardt K, Dietrich W, Spannagl M, Heindl B, Zwissler B. Whole blood multiple electrode aggregometry is a reliable point-of-care test acetylsalicylic acid induced platelet dysfunction. *Anesth Analg*. 2009;109(1):25-31.

59. Juul-Moller S, Edvardsson N, Jahnmatz B, Rosén A, Sörensen S, Omblus R. Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris. *Lancet*. 1992;340(8833):1421-5.
60. Kalow W. Pharmacogenetics and personalised medicine. *Fundam Clin Pharmacol*. 2002;16(5):337-42.
61. Kantor TG. Ibuprofen. *Ann Intern Med*. 1979; 91:877-82.
62. Kastrati A, Koch W, Gawaz M, Mehilli J, Böttiger C, Schömig K, et al. PLA polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of adverse events after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(1):84-9.
63. Kidson-Gerber G, Weaver J, Gemmell R, Prasan AM, Chong BH. Serum thromboxane B2 compared to five other platelet function tests for the evaluation of aspirin effect in stable cardiovascular disease. *Heart Lung Circ*. 2010 Apr;19(4):234-42.
64. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin “resistance” and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2007; 1:1-8.
65. Latini R, Tognoni G, Maggioni A, Baigent C, Braunwald E, Collins R, et al. Clinical effects of early ACE inhibitor treatment for acute myocardial infarction are similar in the presence and absence of aspirin: meta-analysis of individual data from nearly 96.000 randomized patients. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:1801-7.
66. Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Ômega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(7):585-94.
67. Le Hello C, Morello R, Lequerrec A, Duarte C, Riddell J, Hamon M. Effect of PLA1/A2 glycoprotein IIIa gene polymorphism on the long-term outcome after successful coronary stenting. *Thromb J*. 2007;5:19.
68. Le Hello RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P. *Braunwald tratado de doenças cardiovasculares*. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 8a. ed.; 2010.
69. LeBlanc M, Zuber V, Andreassen BK, Witoelar A, Zeng L, Bettella F, et al. Identifying novel gene variants in coronary artery disease and shared genes with several cardiovascular risk factors. *Circ Res*. 2015 Oct 20. pii: CIRCRESAHA.115.306629.
70. Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC. Cyclooxygenase polymorphisms and risk of cardiovascular events: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Jan;83(1):52-60.

71. Lepäntalo A, Mikkelsen J, Reséndiz JC, Viiri L, Backman JT, Kankuri E, et al. Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost.* 2006 feb;95(2):253-9.
72. Leung WY, So W, Steward D, Lui A, Tong PC, Ko GT, et al. Lack of benefits for prevention of cardiovascular disease with aspirin therapy in type 2 diabetic patients – a longitudinal observational study. *Cardiovasc Diabetol.* 2009;8:57-67.
73. Lewis JP, Ryan K, O'Connell JR, Horenstein RB, Damcott CM, Gibson Q, et al. Genetic variation in *pear1* is associated with platelet aggregation and cardiovascular outcomes. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013 Apr;6(2):184-92.
74. Libby P, Aikawa, Jain MK: *Vascular endothelium and atherosclerosis*. Hand Exp Pharma OL: 285, 2006.
75. Loew D, Vinazzer H. Dose-dependent influence of acetylsalicylic acid on platelet functions and plasmatic coagulation factors. *Haemostasis.* 1976;5(4):239-49.
76. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Ragot S, Allal J, et al. Resistance *in vitro* to low dose aspirin is associated with platelet *PIA1* (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalpha) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(6):1115-9.
77. MacDonald TM, Wei L. Effect of ibuprofen on cardio protective effect of aspirin. *Lancet.* 2003;361:573-4.
78. Mane VP, Heuer MA, Hillyer P, Navarro MB, and Rabin RL: Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis. *J Biomol Techniques.* 2008, 19:342-347.
79. Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost.* 2005 Oct;3(10):2340-5.
80. Michelson AD, Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nature Rev Drug Discov.* 2010; 9:154-69.
81. Michelson A.D. Methods for the Measurement of platelet function. *Am J Cardiol.* 2009;103(Suppl):20-6.
82. Moodie RL. *Paleopathology: an introduction to the study of ancient evidences of disease*. Urbana, IL: University of Illinois Press, 1923.
83. Morotz LA. Increased blood fibrinolytic activity after aspirin ingestion. *N Engl J Med.* 1977;296(10):525-9.

84. Ogawa H, Nakayama M, Morimoto T, Uemura S, Kanauchi M, Doi N, et al. Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008;300:2134-214.
85. Papathanasiou A, Goudevenos J, Tselepis AD. Aspirin resistance in cardiovascular disease: pathogenesis, diagnosis and clinical impact. *Curr Pharm Des*. 2009;15(10):1085-94.
86. Papp E, Havasi V, Bene J, Komlosi K, Talian G, Feher G, et al. Does glycoprotein IIIa gene (PI(A)) polymorphism influence clopidogrel resistance? A study in older patients. *Drugs Aging*. 2007;24(4):345-50.
87. Pasternak RC, Brown LE, Stone PH, Silverman DI, Gibson CM, Sacks FM. Effect of combination therapy with lipid-reducing drugs in patients with coronary heart disease and "normal" cholesterol levels. A randomized, placebo-controlled trial. Harvard Atherosclerosis Reversibility Project (HARP) Study Group. Pasternak. *Ann Intern Med*. 1996 Oct 1;125(7):529-40.
88. Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP, et al. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke; 2002. Update: Consensus Panel Guide to comprehensive risk reduction for adult patients without coronary or other atherosclerotic. Vascular Disease. American Heart Association. Science Advisory and Coordinating Committee. *Circulation*. 2002;106(3):388-91.
89. Peerschke EI, Castellone DD, Stroobants AK, Francis J. Reference range determination for whole-blood platelet aggregation using the Multiplate analyzer. *Am J Clin Pathol*. 2014 Nov;142(5):647-56.
90. Persson K, Hamby K, and Ugozzoli LA: Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction-overcoming its limitation. *Anal Biochem*. 2005;344:33-42.
91. Petricevic M, Bioseka B, Konosic S, Biscar I, Siric F, Mihaljevic MZ, et al. Definition of acetylsalicylic acid resistance in whole blood impedance aggregometry in patients undergoing coronary artery surgery. *Coll Antropol*. 2013;37(3):833-9.
92. Postula M, Tarchalska-Krynska B, Filipiak KJ, Kosior D, Serafin A, Huczek Z, et al. Factors responsible for aspirin resistance-can we identify them? *Kardiologia Pol*. 2010;68:412-413.
93. Rafferty M, Walters MR, Dawson J. Anti-platelet therapy and aspirin resistance – clinically and chemically relevant. *Curr Med Chem*. 2010;17:4578-86.
94. Ratnatunga C, Edmondson S, Rees G, Kovacs IB. High-dose aspirin inhibits shear-induced platelet reaction involving thrombin generation. *Circulation*. 1992;85(3):1077-82.

95. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997;336:973-9.
96. Ridker PM, Manson JE, Gaziano JM, Buring JE, Hennekens CH. Low-dose aspirin therapy for chronic stable angina. A randomized placebo-controlled clinical trial. *Ann Intern Med*. 1991;114:835-9.
97. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*. 1997;349(9049):385-8.
98. RISC Group. Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease. *Lancet*. 1990;336(8719):827-30.
99. Rocca B, Petrucci G. Variability in the responsiveness to low-dose aspirin: pharmacological and disease-related mechanisms. *Thrombosis*. 2012;2012:376721.
100. Rogans JA, More on fish oil. *N Engl J Med*. 1987;316:624-8
101. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie KGOA, Greenlund, K, Haase N, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee Heart disease and stroke statistics – 2007 update: a report from American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007; 115:E69-171.
102. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
103. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature Med*. 2002;8:1227-34.
104. Sacks FM, Stone PH, Gibson CM, Silverman DI, Rosner B, Pasternak RC. Controlled trial of fish oil for regression of human coronary atherosclerosis. HARP Research Group. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Jun;25(7):1492-8.
105. Salamani NJ, Lodnick D. Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction *Cardiovasc Res*. 1997 mar; 33(3)693-7. Salem Jr N, Litman HY, Kim K, Gawrisch K. Mechanisms of action of docosahexaenoic in the nervous system. *Lipids*. 2001; 36(9):945-59.
106. SALT Collaborative Group. Swedish aspirin low-dose trial (SALT) of 75 mg aspirin as secondary prophylaxis after cerebrovascular ischemic events. *Lancet*. 1991;338(8779):1345-9.
107. Sandercock P, Lindley R, Wardlaw J, Dennis M, Lewis S, Venables G, et al. Third international stroke trial (IST-3) of thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Trials*. 2008;9:37.

108. Sandison AT. Degenerative vascular diseases. In: Broth Mell D, Sandison AT, EDS. *Diseases in antiquity: a survey of the diseases, injuries and surgery of early populations*. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1967. p. 474-88.
109. Schacky CV, Angerer P, Kothny W, Theisein K, Mudra H. The effect of dietary w-3 fatty acids on coronary atherosclerosis, SCIMO. *Ann Intern Med*. 1999;130:554-62.
110. Segal R, Lubart E, Leibovitz A, Berkovitch M, Habot B, Yaron M, et al. Early and late effects of low dose aspirin on renal function in elderly patients. *Am J Med*. 2003;115:462-6.
111. Senbanerjee S. Linz, Atkins GB, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, et al: KLFZ is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med*. 2004;199:1305.
112. Sgunuzy K, Mitchel R, Libby P: Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc*. 2006;26:987.
113. Shiffman D, Chasman DI, Ballantyne CM, Nambi V, Devlin JJ, Boerwinkle E. Coronary heart disease risk, aspirin use, and apolipoprotein(a) 4399Met allele in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Thromb Haemost*. 2009 Jul;102(1):179-80.
114. Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(3 Suppl):560S-9S.
115. Sinclair HM. Wartime nutrition in England as a public health problem. *Am J Public Health Nations Health*. 1944;34(8):828-32.
116. Streptokinase in recent myocardial infarction: a controlled multicentre trial. European Working Party. *Br Med J*. 1971;325-31.
117. Su G, Wang Z, Ding Y, Association of the platelet membrane glycoprotein I a C807T gene polymorphism with aspirin resistance; 2007, *Univ Sci Technolog Med Sci*; Dec:27(6):664-7
118. Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res*. 2008;122(6):786-803.
119. Teo KK, Yusuf S, Pfeffer M, Torp-Pedersen C, Kober L, Hall A, et al. Effects of long-term treatment with angiotensin – converting – enzyme inhibitors in the presence or absence of aspirin: a systematic review. *Lancet*. 2002;115:462-6.
120. Turpie A, Gent G, Laupacis A, Latour Y, Gunstensen J, Basile F, et al. A comparison of aspirin with placebo in patients treated with warfarin after heart valve replacement. *N Engl J Med*. 1993;329(8):524-9.

121. UK-TIA Study Group. The United Kingdom Transient Ischaemic Attack (UK-TIA) Aspirin Trial: final results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991;54:1044-54.
122. US Preventive Services Task Force. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: recommendation and rationale. *Ann Intern Med*. 2002;136(2):157-60.
123. Vericel E, Rey C, Calzada C, Haond P, Chapuy PH, Lagarde M. Age related changes in arachidonic acid peroxidation and glutathione peroxidase activity in human platelets. *Prostaglandins*. 1992;43(1):75-85.
124. Verlengia R, Curi R, Bevilacqua E, Newsholme P *Análises de RNA proteínas e metabólitos: metodologia e procedimentos técnicos*. Editora Santos 2013. p. 95-121.
125. von Pape KW, Dzijan-Horn M, Bohner J, Spannagl M, Weisser H, Calatzis A. Control of aspirin effect in chronic cardiovascular patients using two whole blood platelet function assays. Pfa-100 and Multiplate. *Hamostaseologie*, 2007. 27(3):p. 155-60.
126. Vorchheimer DA, Becker R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(1):59-68.
127. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE; Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding human platelets. *Blood*. 1996;88(3):907-14
128. Wallentin LC. Aspirin (75 mg/day) after an episode of unstable coronary artery disease: long-term effects on the risk for myocardial infarction, occurrence of severe angina and the need for revascularization. Research Group on Instability in Coronary Artery Disease in Southeast Sweden. *J Am Coll Cardiol*. 1991;Dec;18(7):1587-93.
129. Wang BY, Tan SJ. Platelet glycoprotein IIIa gene polymorphism (Leu33Pro) and aspirin resistance in a very elderly Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014 Jun;18(6):389-93.
130. Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin) – its relation to metabolic control. *Thromb Res*. 2004; 113:101-113.
131. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med*. 1996;334(17):1090-4.
132. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S: Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol*. 1999, 17:804-7.

133. Wiwanitkit V. PIA1/A2 polymorphism of the platelet glycoprotein receptor IIb/IIIa and its correlation with myocardial infarction: an appraisal. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2006;12(1):93-5.
134. Wright TN, Merrilees MJ: Proteoglycans in Atherosclerosis and a Restonosis: Key Roles for Versican. *Circ Res*. 2004;94:1158.
135. Xu ZH, Jiao JR, Yang R, Luo BY, Wang XF, Wu F, Aspirin resistance clinical significance and genetic polymorphism. *J Int. Med Res*. 2012; 40(1); 282-92.
136. Zimmermann N, Hohlfeld T. Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost*. 2008; 100:379-390.