

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas**

**Análise transcriptômica de miRNAs em pacientes sob dupla terapia de
antiagregação**

Juliana de Freitas Germano

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas para a
obtenção do Título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Mario H. Hirata

São Paulo

2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas**

**Análise transcriptômica de miRNAs em pacientes sob dupla terapia de
antiagregação**

Juliana de Freitas Germano

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas para a
obtenção do Título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Mario H. Hirata

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Germano, Juliana de Freitas

G373a Análise transcriptômica de miRNAs em pacientes sob dupla
terapia de antiagregação / Juliana de Freitas Germano. -- São
Paulo, 2015.
134p.

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

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Farmacogenética 2. Biologia molecular 3. Doenças
cardiovasculares I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.0756 CDD

Juliana de Freitas Germano

**Análise transcriptômica de miRNAs em pacientes com dupla terapia de
antiagregação**

Comissão Julgadora
da
Tese para Obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me guiado nos caminhos que eu escolhi na vida, por ter permitido que eu pudesse conhecer pessoas que foram fundamentais à minha evolução como ser humano e como profissional, e por ter me dado sabedoria para passar pelos momentos de dificuldade;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata, por ter me dado a oportunidade de participar do seu grupo de alunos de pós-graduação, por acreditar na minha capacidade de fazer o doutorado direto, por instigar em mim o desenvolvimento de habilidades científicas, e por todo o apoio antes e durante o programa;

À Professora Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata, pelo integral apoio que me foi prestado e pelos ensinamentos a mim repassados, numa clara mostra de como se atingir, principalmente, os ideais acadêmicos;

Aos meus pais, educadores que são, por todos os ensinamentos que me deram durante a vida, pelos valores adquiridos ao longo desses anos, e pelo total incentivo às minhas escolhas;

Aos meus colegas do LBMAD - USP, principalmente pela amizade e companheirismo durante esta jornada, mas também pela colaboração técnica;

A todos os pacientes que participaram deste estudo, sem os quais eu não poderia desenvolver o projeto em busca do objetivo proposto;

À equipe de funcionários da Hemodinâmica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, principalmente ao Dr. Louis Ohe, pelas dúvidas sanadas e pela amizade; à Jucélia, pela companhia durante a seleção dos pacientes; e às auxiliares de enfermagem e à equipe médica, pela ajuda prestada e pelo compartilhamento do espaço físico, permitindo que eu recebesse os voluntários;

À equipe de funcionários, estagiários e alunos do Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, que fizeram parte dessa minha longa caminhada.

GERMANO, J.F. **Análise transcriptômica de miRNAs em pacientes sob dupla terapia de antiagregação**. 2015. 134p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A terapia antiagregante é comumente indicada na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. A dupla antiagregação com clopidogrel e ácido acetilsalicílico (AAS) tem sido frequentemente adotada em pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC), mas apresenta ineficácia em uma parcela significativa da população com genótipo de respondedores. Essa falha terapêutica nos leva a questionar se outros mecanismos moleculares podem estar influenciando na resposta a esses fármacos. Recentes estudos sugerem que pequenas sequências de RNA não codificantes denominadas microRNAs (miRNAs) podem estar fortemente relacionadas com resposta ao tratamento fármaco-terapêutico, controlando as proteínas envolvidas na farmacocinética e farmacodinâmica. Entretanto, os principais miRNAs que atuam na dinâmica da resposta medicamentosa ainda não foram bem definidos. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de miRNAs no sangue total periférico, procurando melhor esclarecer os mecanismos envolvidos na resposta aos antiagregantes plaquetários AAS e clopidogrel. Para isso, selecionou-se pacientes com DAC, os quais apresentavam diferentes respostas à dupla terapia de antiagregação determinadas pelo teste de agregação plaquetária. Baseados nos fenótipos, os perfis de expressão de miRNAs foram comparados entre os valores da taxa de agregação categorizados em tercís (T) de resposta. O grupo T1 foi constituído de pacientes respondedores, o T2 de respondedores intermediários e o T3 de não respondedores. Os perfis de miRNAs foram obtidos após sequenciamento de última geração e os dados obtidos foram analisados pelo pacote *Deseq2*. Os resultados mostraram 18 miRNAs diferentemente expressos entre os dois tercís extremos. Dentre esses miRNAs, 10 deles apresentaram importantes alvos relacionados com vias de ativação e agregação plaquetária quando analisados pelo software *Ingenuity*®. Dos 10 miRNAs, 4 deles, os quais apresentaram-se menos expressos no sequenciamento, demonstraram os mesmos perfis de expressão quando analisados pela reação em cadeia pela polimerase quantitativa (qPCR): hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p. A partir das análises de predição de alvos, pôde-se observar que os quatro miRNAs, quando menos expressos simultaneamente, predizem ativação da agregação plaquetária. Além disso, os miRNAs hsa-miR-423-5p, hsa-miR-744-5p e hsa-let-7g-5p mostraram correlação com o perfil lipídico dos pacientes que, por sua vez, apresentou influência nos valores de agregação compreendidos no T3 de resposta a ambos os medicamentos. Sendo assim, conclui-se que maiores taxas de agregação plaquetária podem estar indiretamente relacionadas com os padrões de expressão de hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p e hsa-let-7g-5p. Sugere-se que a avaliação do perfil de expressão destes 3 miRNAs no sangue periférico de pacientes com DAC possa prever resposta terapêutica inadequada ao AAS e ao clopidogrel.

Palavras-chave: AAS, clopidogrel, Doença Arterial Coronariana, miRNA, sequenciamento de última geração.

GERMANO, J.F. **Transcriptomic analysis of miRNAs on patients in dual antiplatelet therapy**. 2015. 134p. Thesis (Doctorate Degree) - School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

ABSTRACT

The antiplatelet therapy is often indicated for the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and acetylsalicylic acid (ASA) has often been adopted in patients with coronary artery disease (CAD), but it has been ineffective in a significant portion of the population with genotype of responders. This fact leads us to question whether other molecular mechanisms may be influencing the response to these drugs. Recent studies suggest that small non-coding RNA sequences known as microRNAs (miRNAs) may be closely related to response to drug-therapeutic treatment, controlling proteins involved in pharmacokinetics and pharmacodynamics. The aim of this study was to evaluate the profile of miRNAs in whole blood, looking to better clarify mechanisms involved in ASA and clopidogrel response. For this purpose, we selected CAD patients who showed different responses to dual antiplatelet therapy determined by aggregation test. Based on the phenotypes, the miRNA expression profiles were compared between the platelet aggregation values categorized into tertiles (T) of response. The T1 group consisted of responding patients, the T2 consisted of intermediate responders and the T3 consisted of non-responders. The miRNA profiles were obtained after next-generation sequencing and data were analyzed by Deseq2 package. Results showed that 18 miRNAs were differentially expressed between the two extreme tertiles. By Ingenuity® software prediction analysis, 10 miRNAs showed important targets related with activation and aggregation of blood platelets. Of the 10 miRNAs, 4 of them, which were down-expressed on sequencing, showed the same fold-regulation when expression profiles were analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR): hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p and hsa-let-7g-5p. By target prediction analysis, it was observed that, when the four miRNAs are simultaneously down-expressed, they predict activation of platelet aggregation. Furthermore, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-744-5p, and hsa-let-7g-5p showed correlation with the lipid profile of patients which, in turn, demonstrated influence in aggregation values reaching T3 of response to both drugs. Therefore, we concluded that increased platelet aggregation rates may be indirectly related to the expression profiles of hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p and hsa-let-7g-5p. It is suggested that the evaluation of the expression profile of these three miRNAs in the peripheral blood of patients with CAD may predict inadequate therapeutic response to aspirin and clopidogrel.

Keywords: Aspirin, clopidogrel, Coronary Artery Disease, miRNA, next-generation sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Ácido Acetil-salicílico
ADP – Difosfato de adenosina
ALT – Alanina Transaminase
ANOVA – Análise de Variâncias
ApoE – Apolipoproteína E
AST – Aspartato Transaminase
ATP – Adenosina trifosfato
ATP2A2 – ATPase 2
BD – *Becton Dickinson Company*
Ca⁺² – Cálcio iônico
cDNA – DNA complementar
COX-1 – Ciclo-oxigenase 1
COX-2 – Ciclo-oxigenase 2
Ct – Ciclo de *threshol*
CXCR1 – Receptor de quimiocina CXC 1
CXCR2 – Receptor de quimiocina CXC 2
DAC – Doença Arterial Coronariana
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs – Deoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
GPIIb/IIIa – Glicoproteína IIb/IIIa
Hb – Hemoglobina
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HDLc – Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HUDA – Horário da Última Dose de AAS
HUDC – Horário da Última Dose de Clopidogrel
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio
IC95% - Intervalo de Confiança de 95%
IDPC – Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IECA – Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IGF1 – Somatomedina C
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina-8
IMC – Índice de Massa Corporal
ITGB3 – Integrina Beta 3
ITGA2 – Integrina Alfa 2
LDLc – Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LIMC – Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia
MDR1 – Proteína-1 resistente a múltiplos fármacos
miR – microRNA
miRNA – microRNA
m7G cap – 7-metilguanossina
MPL – Receptor de trombopoietina
MMP2 – Metaloproteinase 2
OR – *Odds Ratio*
p – Valor de p

PAR-1 – Receptor ativado por protease 1
PAR-4 – Receptor ativado por protease 4
PCRus – Proteína C-reativa ultrasensível
P-gp – Glicoproteína-P
PI3-K – Fosfoinositídeo 3-quinase
Pré-miRNA – miRNA precursor
Pri-miRNA – miRNA primário
PSGL-1 – Glicoproteína Ligante de P-Selectina 1
PTGS2 – Prostaglandina endoperoxidase sintase 2
P2RX1 – Receptor purinérgico P2X
qPCR – Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
RHOG – Membro g da família de homólogos rag
RIN – Número de Integridade de RNA
RISC – Complexo de Inativação Induzido por RNA
RNA – Ácido ribonucleico
RNAm – Ácido Ribonucleico Mensageiro
RTA – *Software* de análise em tempo real
SBS – Sequenciamento por síntese
SCA – Síndrome Coronariana Aguda
SNPs – Polimorfismos de Único Nucleotídeo
T1 – Tercil 1 de resposta ao AAS e ao Clopigorel
T2 - Tercil 2 de resposta ao AAS e ao Clopigorel
T3 - Tercil 3 de resposta ao AAS e ao Clopigorel
TG – Triglicérides
TIMP2 – Inibidor da metalopeptidase 2
TRAP – Peptídeo Ativador do Receptor de Trombina
TXA2 – Tromboxana A2
UTR – Região Não-Traduzida
VEGFA – Fator de crescimento do endotélio vascular
VLDLc – Colesterol de Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
WHO – *Organização Mundial da Saúde*

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.	
Tabela 1	Características clínico-laboratoriais e dados biodemográficos dos pacientes em relação aos tercis de resposta ao AAS.....	50
Tabela 2	Correlação das variáveis laboratoriais com os valores de ASPIteste.....	54
Tabela 3	Análise multivariada da influência dos medicamentos concomitantemente administrados na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS.....	55
Tabela 4	Análise multivariada da influência dos fatores de risco na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS.....	55
Tabela 5	Análise multivariada da influência das características laboratoriais na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS..	56
Tabela 6	Análise multivariada da influência dos fatores de risco e de características laboratoriais na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS.....	57
Tabela 7	Análise univariada da influência dos fatores de risco e das características clínicas na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS.....	58
Tabela 8	Características clínicas e laboratoriais e dados biodemográficos dos pacientes em relação aos tercis de resposta ao clopidogrel	59
Tabela 9	Correlação das variáveis laboratoriais com os valores de ADPteste.....	62
Tabela 10	Análise multivariada da influência dos medicamentos concomitantemente administrados na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel.....	63
Tabela 11	Análise multivariada da influência dos fatores de risco na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel.....	64
Tabela 12	Análise multivariada da influência das características laboratoriais na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel.....	64
Tabela 13	Análise multivariada da influência dos fatores de risco e das características laboratoriais na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel.....	65
Tabela 14	Análise univariada da influência das características clínicas e dos fatores de risco na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel.....	66
Tabela 15	Dados do sequenciamento das amostras de T1 e T3 de acordo com a análise do software <i>CLC Genomics</i>	68
Tabela 16	Resultados ilustrando os miRNAs diferentemente expressos no grupo de não respondedores (T3).....	71
Tabela 17	Resultados da comparação da expressão por qPCR dos miRNAs entre o grupo de não respondedores e respondedores nas amostras sequenciadas.....	78

Tabela 18	Resultados da comparação da expressão dos miRNAs entre o grupo de não respondedores e respondedores nas replicatas biológicas.....	80
Tabela 19	Correlação dos valores de expressão dos miRNAs hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p com as variáveis laboratoriais.....	83
Tabela 20	Análise univariada da influência de hsa-let-7g-5p, hsa-miR-744-5p e hsa-miR-30a-5p no perfil lipídico dos pacientes.....	88
Tabela 21	Valores de expressão de hsa-let-7g-5p e hsa-miR-744-5p nas categorias de pacientes dislipidêmicos e não dislipidêmicos e nas categorias de dosagem colesterol total e HDLc, respectivamente.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Comparação das principais causas de morte na última década no mundo, envolvendo os anos entre 2000 e 2011.....	19
Figura 2	Distribuição global de mortes por doenças não comunicáveis em pessoas de ambos os sexos.....	20
Figura 3	<i>Ranking</i> dos 10 principais fatores de risco que levam à morte..	21
Figura 4	Biogênese dos miRNAs.....	27
Figura 5	Esquema demonstrando a ligação do miRNA maduro ao RNAm alvo.....	28
Figura 6	Fluxograma de coleta com a identificação das subseqüentes análises realizadas em cada tipo de tubo.....	37
Figura 7	Fluxograma da divisão dos pacientes em tercís de resposta.....	39
Figura 8	Perfil da taxa de agregação plaquetária de pacientes dos grupos T1 e T3.....	40
Figura 9	Fotografia do gel 6% de poliacrilamida (1mm) mostrando o fragmento correspondente aos miRNAs ligados aos adaptadores.....	42
Figura 10	Gráficos de eletroforese em microcapilares de análise de DNA de alta sensibilidade obtidos pelo equipamento <i>Bioanalyzer</i> 2100 da Agilent	43
Figura 11	Fluxograma da análise estatística.....	48
Figura 12	Tercís de resposta aos antiagregantes AAS e clopidogrel.....	49
Figura 13	Gráficos representando a distribuição das categorias das variáveis qualitativas entre os tercís de ASPIteste.....	52
Figura 14	Gráfico de caixas com barras de erro no modelo Tukey e diagramas de dispersão demonstrando associação de variáveis laboratoriais com os valores de agregação em resposta ao AAS.....	52
Figura 15	Gráfico em caixas com barras de erro (Tukey) e diagramas de dispersão representando variáveis laboratoriais com diferenças estatisticamente significativas encontradas entre os valores de ADPteste.....	61
Figura 16	Porcentagem de Q30 e densidade dos agrupamentos em cada sequenciamento.....	67
Figura 17	Porcentagem de <i>reads</i> alinhadas a miRNAs e a outras seqüências nas amostras de T1, de acordo com o <i>Miseq Reporter</i>	68
Figura 18	Porcentagem de <i>reads</i> alinhadas a miRNAs e a outras seqüências nas amostras de T3, de acordo com o <i>Miseq Reporter</i>	69
Figura 19	Gráficos de caixa com barras de erro no modelo Tukey representando o número de <i>reads</i> dos miRNAs mais expressos estatisticamente significativos no tercil de pacientes não respondedores (T3) ao AAS e ao clopidogrel.....	71

Figura 20	Gráficos de caixa com barras de erro no modelo Tukey representando o número de <i>reads</i> dos miRNAs menos expressos estatisticamente significativos no tercil de pacientes não respondedores (T3) ao AAS e ao clopidogrel	73
Figura 21	Diagrama de análise bioinformática no software <i>Ingenuity®</i>	75
Figura 22	Gráfico de barras dos resultados de expressão relativa representando os miRNAs mais ou menos expressos nos pacientes não respondedores ao AAS e ao clopidogrel.....	78
Figura 23	Gráfico de dispersão das correlações dos miRNAs com expressão semelhante entre sequenciamento e qPCR.....	79
Figura 24	Gráfico de barras dos resultados de expressão relativa dos miRNAs mais ou menos expressos nas replicatas biológicas, correspondente ao perfil de pacientes não respondedores ao AAS e ao clopidogrel.....	81
Figura 25	Diagrama de análise bioinformática no software <i>Ingenuity®</i> , mostrando os alvos dos miRNAs com perfis de expressão semelhantes entre o sequenciamento e a qPCR.....	82
Figura 26	Distribuição dos valores de expressão de hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p entre as categorias dos fatores de risco para DAC.....	84
Figura 27	Distribuição dos valores de expressão de hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p entre as categorias de uso de medicamentos concomitantemente administrados.....	86
Figura 28	Gráficos de metanálise representando o efeito da expressão ($2\Delta Ct$) de hsa-let-7g-5p, hsa-miR-744-5p e hsa-miR-423-3p sobre os perfis lipídicos característicos de dislipidemia.....	89
Figura 29	Valores de expressão de hsa-miR-744-5p entre as categorias dosagem de colesterol total e dosagem de HDLc.....	90
Figura 30	Interação dos miRNAs confirmados com os parâmetros laboratoriais e fatores de risco que influenciam na resposta antiagregante e no desenvolvimento de DAC	115

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Doença Arterial Coronariana (DAC) – Epidemiologia	19
1.2 Fisiopatologia e conduta terapêutica da DAC	21
1.3 Resistência aos antiagregantes AAS e clopidogrel.....	23
1.4 MiRNAs – Biogênese e função	25
1.5 MiRNAs como biomarcadores.....	28
1.6 MiRNAs e Farmacogenômica	30
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	35
3.1 Casuística	35
3.1.1 Critérios de exclusão	36
3.2 Amostra biológica.....	36
3.3 Determinações laboratoriais	38
3.4 Determinação da taxa de inibição de agregação plaquetária	38
3.5 Extração de miRNA.....	40
3.6 Preparo das bibliotecas de miRNA	41
3.7 Sequenciamento e análise dos dados	44
3.7.1 Sequenciamento por síntese	44
3.7.2 Análise de dados	45
3.8 Confirmação pela qPCR	46
3.9 Análise estatística dos resultados	47
4 RESULTADOS	49
4.1 Dados biodemográficos e características clínico-laboratoriais dos pacientes.....	49

4.1.1 Dados biodemográficos e características clínico-laboratoriais dos pacientes em relação aos tercis de resposta ao AAS.....	50
4.1.2 Dados biodemográficos e características clínico-laboratoriais dos pacientes em relação aos tercis de resposta ao clopidogrel.....	58
4.2 Sequenciamento dos miRNAs	66
4.3 Confirmação dos resultados de sequenciamento pela qPCR	76
4.3.1 Confirmação dos resultados do sequenciamento pela qPCR nas amostras sequenciadas	77
4.3.2 Confirmação dos resultados de sequenciamento pela qPCR nas replicatas biológicas	80
4.3.3 Análise da expressão diferencial dos miRNAs no grupo total de pacientes	82
5 DISCUSSÃO	91
5.1 Parâmetros clínicos e laboratoriais X resposta aos antiagregantes plaquetários	91
5.2 Sequenciamento dos miRNAs	103
5.3 Comparação dos resultados de expressão de sequenciamento e da qPCR	111
6 CONCLUSÃO.....	115
7 REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Arterial Coronariana (DAC) – Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, as quais saltarão de 17,5 milhões de mortes em 2012, representando 31% delas, para 22,2 milhões de mortes em 2030. Dentro dos 31% de mortes por doenças cardiovasculares em 2012, a maior parte delas, que engloba 7,4 milhões de pessoas, foi devida à DAC (WHO, 2014) (**figuras 1 e 2**).

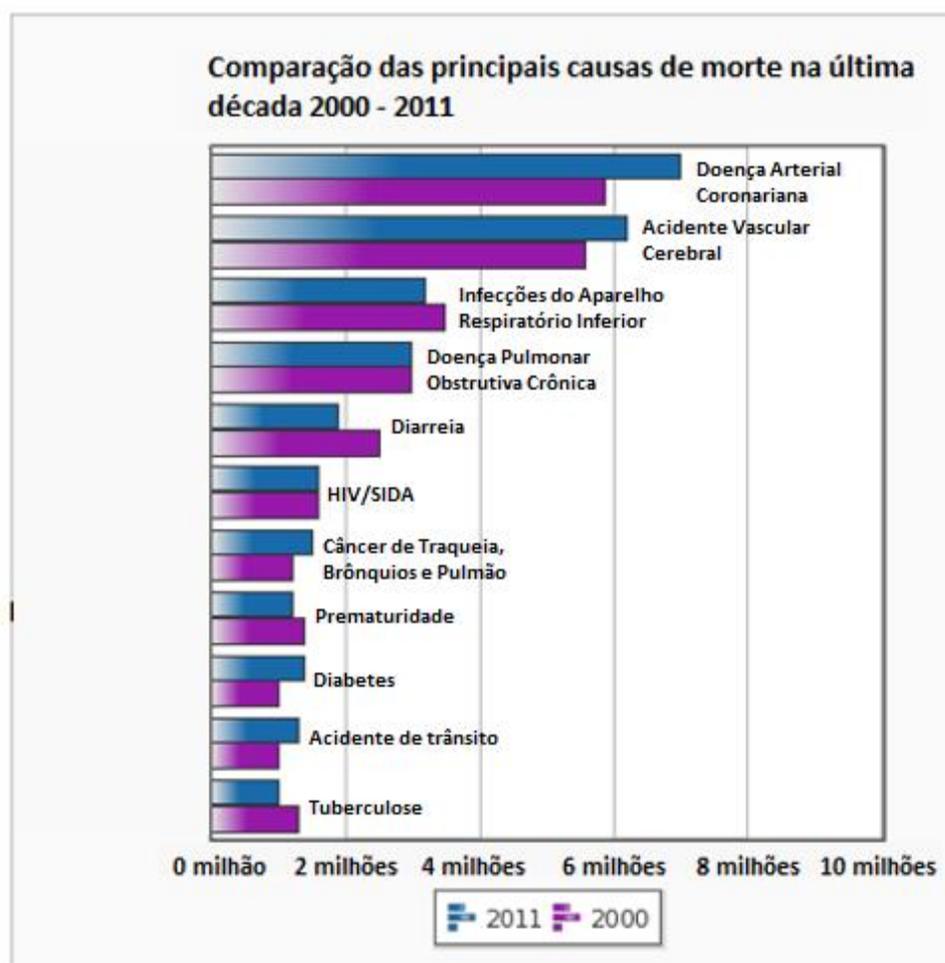


Figura 1. Comparação das principais causas de morte na última década no mundo, envolvendo os anos de 2000 a 2011. HIV, Vírus da Imunodeficiência Humana; SIDA, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Fonte: Adaptado de (WHO, 2013).

No Brasil, acredita-se que a prevalência de DAC entre adultos acima de 40 anos esteja entre 5% e 8% (Polanczyk e Ribeiro, 2009). No ano de 2009, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 29% dos óbitos, sendo a terceira maior causa de hospitalizações no Sistema Único de Saúde (SUS) e representando o maior gasto com internações, totalizando 1,9 bilhões de reais, ou 19% dos gastos (Teich e Araújo, 2011).

Os custos com procedimentos cardiovasculares no Brasil parecem estar diretamente ligados com o índice de desenvolvimento humano e taxa de alfabetização, pois regiões mais ricas como o sul e o sudeste apresentam gastos maiores. Ao mesmo tempo, essas regiões apresentam maior taxa de mortalidade proporcional (Polanczyk e Ribeiro, 2009)

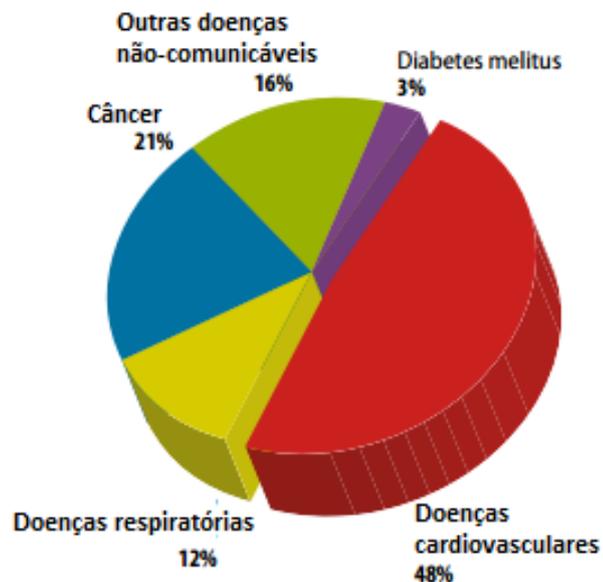


Figura 2. Distribuição global de mortes por doenças não comunicáveis em pessoas de ambos os sexos. Fonte: Adaptado de: (WHO, 2011).

Por ser uma doença complexa, a DAC engloba diversos fatores de risco. Dentre os comportamentais estão o consumo de cigarro e bebidas alcoólicas,

inatividade física e dieta rica em gordura e sal. Dentre os fatores de risco metabólicos estão a hipertensão, o diabetes, a dislipidemia, o sobrepeso e a obesidade (*Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*, 2011) (figura 3).

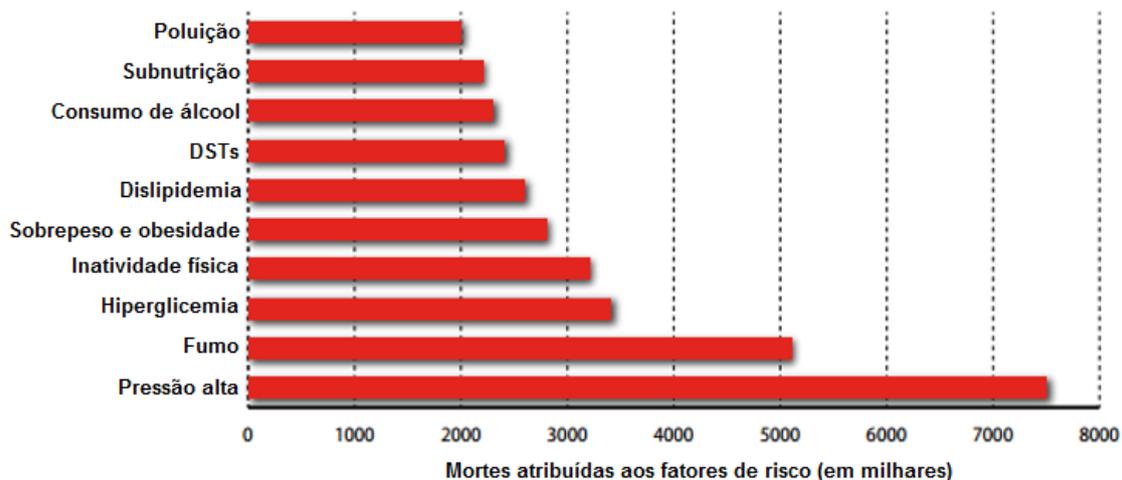


Figura 3. Ranking dos 10 principais fatores de risco que levam à morte. DSTs, Doenças sexualmente transmissíveis. Adaptado de: (Who, 2011).

1.2 Fisiopatologia e conduta terapêutica da DAC

O modelo fisiopatológico que melhor explica a formação de placa de ateroma se baseia na hipótese da “resposta à injúria” endotelial, a qual inicia-se de diversas formas tais como o estresse, o hábito de fumar, obesidade, diabetes, dislipidemias, hipertensão, infecção bacteriana ou viral, distúrbios hormonais (menopausa) entre outros (Mehta, Saldeen e Rand, 1998; Sampaio *et al.*, 2007; Norgard e Abu-Fadel, 2009).

Evidências sugerem que a aterosclerose pode ser classificada como um processo inflamatório envolvendo disfunção de células endoteliais vasculares em resposta às citocinas, fatores de crescimento e forças hemodinâmicas.

Com o recrutamento de monócitos e outros leucócitos para o local, desencadeia-se o processo de formação de células espumosas, acúmulo de estrias gordurosas, migração e proliferação de células do músculo liso vascular e desenvolvimento da capa fibrosa, a qual pode se romper. Daí surge a possibilidade de anti-inflamatórios e imunossupressores poderem ser utilizados na terapia desses pacientes (Chen *et al.*, 2012).

Com o rompimento da placa fibrosa, desencadeia-se o recrutamento de plaquetas, as quais se ligam a proteínas da matriz liberando, assim, adenosina 5'-difosfato (ADP), tromboxana A₂ (TXA₂), cálcio e serotonina, promovendo a produção local de trombina, os quais, juntos, causam amplificação da ativação e propagação de plaquetas para o local (Marczewski, Postula e Kosior, 2010). Quando agregadas, as plaquetas levam à formação do trombo, oclusão vascular, isquemia e necrose com substituição de tecido muscular por tecido fibroso denso sendo que, todos esses fatores, em conjunto, caracterizam a SCA (Jakubowski *et al.*, 2007).

Devida a estrita relação das plaquetas com o processo aterotrombótico, os medicamentos mais usados na terapia desses pacientes são os antiagregantes plaquetários, como o AAS, as tienopiridinas (ticoplidina, clopidogrel, ticagrelor e prasugrel) e os inibidores dos receptores GPIIb/IIIa (Kumar e Cannon, 2009; O'keefe, Carter e Lavie, 2009), sendo que a dupla terapia de antiagregação com AAS e clopidogrel é o tratamento de escolha para pacientes com DAC submetidos a implante de stent (Müller, 2012; Steg *et al.*, 2012).

1.3 Resistência aos antiagregantes AAS e clopidogrel

A falha ao tratamento farmacológico pode estar associada à variabilidade interindividual genética, que contribui de forma marcante com as diferentes respostas ao tratamento. A presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes que estão relacionados com a farmacocinética e farmacodinâmica podem interferir de forma marcante na resposta terapêutica, além da interação medicamentosa ou mesmo de competição por vias metabólicas comuns, que podem determinar o efeito terapêutico muito diferenciado em um tratamento desejável (Peters *et al.*, 2009).

A resistência ao AAS pode ter origem multifatorial, como a diminuição na absorção e/ou o aumento do metabolismo, assim como a formação de TXA₂ por meios que não são inibidos pelo uso da droga. Fatores genéticos como o polimorfismo, exemplificado pela variante P1A1/A2 do receptor GPIIb/IIIa das plaquetas, também podem contribuir para o aparecimento de resistência ao medicamento em indivíduos saudáveis (Goodman, Ferro e Sharma, 2008).

No entanto, estudos mostram que a frequência do polimorfismo P1A1/A2 entre indivíduos saudáveis e indivíduos com infarto agudo do miocárdio (Burr *et al.*, 1992; Lagercrantz *et al.*, 2003), doença cardíaca isquêmica (Durante-Mangoni *et al.*, 1998) ou acidente vascular cerebral (AVC) (Carlsson *et al.*, 1997; Streifler *et al.*, 2001) não foram diferentes. A resistência ao AAS tem sido considerada como falha no tratamento. Por isso, a identificação de mecanismos reguladores de expressão pode esclarecer os casos de resistência e procurar novas alternativas terapêuticas (Muir *et al.*, 2009).

No caso do clopidogrel, foi demonstrado que a falta de resposta adequada em pacientes com DAC pode estar associada, independentemente das variáveis clínicas, com a expressão elevada de ABCC3 - uma proteína transportadora envolvida na resistência a múltiplos fármacos - em células do sangue periférico (Luchessi *et al.*, 2012)

O polimorfismo da *CYP2C19*2* também tem sido relacionado com resistência ao clopidogrel. Porém, Pettersen e colaboradores (2011) demonstraram que nem todos os pacientes que apresentavam resistência ao clopidogrel possuíam esta alteração. Shuldiner e colaboradores (2009) constataram que o polimorfismo de *CYP2C19*2* explica apenas 12% das variações na reatividade plaquetária. Já Hochholzer e colaboradores (2010) reportaram que 22,4% dos homozigotos para o polimorfismo *CYP2C19*1* (funcional) apresentam reatividade plaquetária comprometida. Portanto, outros mecanismos podem estar interferindo nesse processo.

Angiolillo e colaboradores (2009) publicaram uma revisão analisando os aspectos da variabilidade na resposta aos antiagregantes e os diferentes métodos para sua determinação. Alertaram que a variabilidade na resposta farmacológica poderia ser um problema clínico emergente e apontaram a necessidade de se estudar melhor suas aplicabilidades. Portanto, observa-se que os fundamentos genéticos não explicam todas as variabilidades terapêuticas, o que faz a conduta médica continuar a se basear em experiência clínica.

1.4 MiRNAs – Biogênese e função

Os miRNAs foram descobertos há duas décadas por Lee e colaboradores (1993) enquanto estudavam o desenvolvimento pós-embriônico do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, onde verificaram que uma pequena molécula de RNA (*lin-4*) era responsável pela regulação negativa da expressão da proteína *lin-14*, essencial ao primeiro estágio larval do nematódeo.

A localização genômica dos genes dos miRNAs é variada. Eles podem ser intergênicos, intrônicos ou exônicos, sendo que os miRNAs intergênicos e intrônicos podem formar agrupamentos (*clústeres*) ou não (Olena e Patton, 2010). A formação de agrupamentos geralmente envolve miRNAs relacionados, possuindo sequências quase idênticas, embora isso nem sempre seja uma regra, e o fato de os miRNAs poderem ser originados de uma região intergênica faz com que possam ter promotores específicos (Lau *et al.*, 2001) ou serem transcritos a partir dos promotores de seus genes hospedeiros (Ota *et al.*, 2004). Nos humanos, em torno de 36%-47% dos miRNAs são encontrados em agrupamentos (Griffiths-Jones *et al.*, 2008).

Baseados na identidade de seus genes de origem, os miRNAs podem ser classificados em novas famílias. MiRNAs intrônicos que compartilham a mesma região *seed* (posições entre os nucleotídeos 2-8), por exemplo, podem ser codificados por diferentes genes. Ao mesmo tempo, miRNAs que não possuem a mesma região *seed* podem ser transcritos a partir de íntrons de genes que codificam proteínas relacionadas (Olena e Patton, 2010).

Os genes de miRNAs são transcritos a miRNAs primários (pri-miRNAs) pela Polimerase II, os quais contêm 7-metilguanossina (m^7G cap) na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'. Esses pri-miRNAs são

então clivados, no núcleo da célula, pela enzima Drosha em complexo com a proteína DGCR8, formando o pré-miRNA (miRNA precursor), de ~70nt de comprimento. Com isso, o pré-miRNA é reconhecido pela Exportina 5, um fator de transporte nuclear, a qual transporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma. Nesse local, o pré-miRNA sofre ação da enzima *Dicer*, transformando-se em um duplex de miRNA. As fitas simples maduras 5p e 3p do duplex de miRNA se separam e são, então adicionadas ao complexo RISC (Complexo de Inativação Induzido por RNA), formando, assim, o miRNA maduro de ~22nt de comprimento, capaz de exercer sua função sobre o RNAm alvo (Kim e Nam, 2006) (**figura 4**).

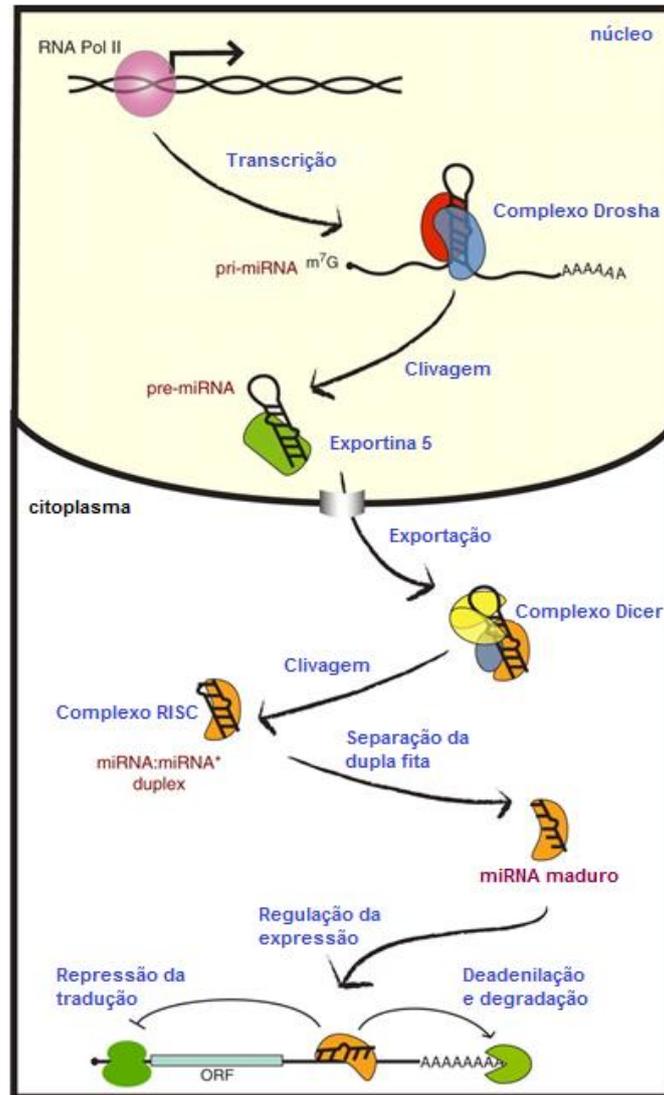


Figura 4. Biogênese dos miRNAs. No núcleo, o DNA é transcrito a pri-miRNAs pela Polimerase II, os quais são clivados pelo complexo da enzima Drosha, formando os pré-miRNAs. Esses pré-miRNAs são então exportados para o citoplasma pela Exportina 5, e clivados pela enzima Dicer, formando um duplex. Uma das fitas do duplex é então escolhida para ser adicionada ao complexo RISC, tendo como alvo os RNAm. Através da ação dos miRNAs maduros, os RNAm serão clivados ou sua expressão será reprimida. m⁷G, 7-metilguanósina; ORF, *Open Reading Frame*; Pre-miRNA, miRNA Precursor; Pri-miRNA, miRNA Primário; RNA Pol II, RNA Polimerase II. Adaptado de: (Davis-Dusenbery e Hata, 2010).

Após a sua adição ao complexo RISC, o miRNA maduro, em várias cópias, exercerá sua função de regulador da expressão gênica através da degradação do RNAm alvo ou através do impedimento da sua tradução. Nos mamíferos, a maior parte das proteínas tem sua expressão diminuída através do mecanismo de degradação das moléculas de RNAm (Guo *et al.*, 2010). Na maioria dos casos, o pareamento miRNA-RNAm é imperfeito. Porém, o mais

importante para a função do miRNA é que haja um pareamento perfeito de seus nucleotídeos da região *seed* com a região 3'UTR (Região não traduzida 3') da molécula de RNAm (Filipowicz, Bhattacharyya e Sonenberg, 2008) (figura 5).

Nos humanos, os efeitos dos miRNAs na expressão de proteínas podem ser sutis, com uma mudança menor do que 2X em uma determinada proteína. Porém, acredita-se que o fato de poderem regular vários transcritos ao mesmo tempo possa resultar em alterações fenotípicas importantes (Mendell e Olson, 2012).

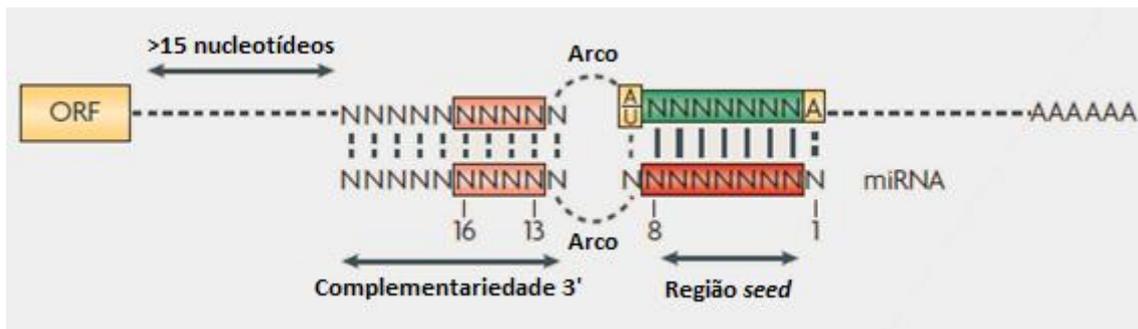


Figura 5. Esquema demonstrando a ligação do miRNA maduro ao RNAm alvo. Em vermelho pode-se observar a região *seed* do miRNA e suas bases complementares em verde no RNAm alvo. Em rosa são destacadas algumas bases entre as posições 13-16 do miRNA, as quais ajudam a manter a estabilidade da ligação e, de preferência, também devem ser complementares ao RNAm alvo. A região em arco também contribui na função dos miRNAs pois impede a ação da enzima Argonata 2, que faz parte do complexo RISC, a qual tem atividade de endonuclease, podendo clivar o RNAm. *ORF*, *Open Reading Frame*. FONTE: adaptado de (Filipowicz, Bhattacharyya e Sonenberg, 2008).

1.5 MiRNAs como biomarcadores

O primeiro estudo demonstrando a relação dos miRNAs com doença foi realizado por Calin e colaboradores (2002), no qual os miRNAs estiveram associados na patogênese do câncer. Desde então, os miRNAs têm demonstrado um importante papel na diferenciação de células malignas de células normais, e observou-se que podem ser encontrados também nos fluídos biológicos (Schöler *et al.*, 2010).

Sendo assim, o sangue total tem sido utilizado como fonte de estudos do perfil do miRNoma de diversas pesquisas por ser facilmente acessível em relação aos outros materiais. Keller e colaboradores (2011) comprovaram a utilidade desse material como fonte de biomarcadores de miRNAs, e constataram que vários miRNAs do sangue total coletado em tubos *PaxGene* (BD) estiveram desregulados em diversas doenças quando comparados com seus respectivos controles, podendo ser utilizados para diferenciar os doentes com 88,5% de acurácia. Além disso, demonstraram que os miRNAs de células sanguíneas podem refletir doenças não necessariamente relacionadas ao sangue.

MiRNAs também podem ser utilizados como biomarcadores de SCA. Freedman e colaboradores (2012) identificaram 609 e 147 miRNAs, respectivamente, ao analisarem os perfis de miRNA pela qRT-PCR em sangue total (tubos *PaxGene*, BD) e em plasma, concluindo que há diferenças nas expressões extra e intracelulares, e que a expressão de determinados miRNAs no plasma podem estar intrinsecamente relacionados à doença coronariana.

Um estudo recente mostra que os miRNAs circulantes podem ter utilidade na prevenção, diagnóstico, prognóstico e na resposta à terapia antiagregante (Li *et al.*, 2013). Até agora, a maioria dos estudos com fluidos envolve a utilização do plasma para a detecção de miRNAs como biomarcadores. Não se sabe ainda como as células sanguíneas mudam seu perfil de miRNAs de acordo com diferentes doenças. Também, a maioria dos estudos com plasma é realizada em pacientes com uma única doença, sem comorbidades. Portanto, é provável que a comparação entre os perfis de

sangue total e plasma de várias doenças possa contribuir para responder essa pergunta.

1.6 MiRNAs e Farmacogenômica

Embora a terapia antiagregante com o uso de clopidogrel e de AAS em pacientes com DAC seja bem estabelecida, até 10% dos pacientes apresentam eventos cardiovasculares a longo prazo após o procedimento de angioplastia (Bhatt *et al.*, 2006).

Sabe-se que nem todos os polimorfismos explicam as variações na resposta aos antiagregantes (Shuldiner *et al.*, 2009) e, pelo fato de os fármacos dependerem da expressão de determinados genes para serem metabolizadas e exercerem sua função no organismo, acredita-se que a presença de mecanismos reguladores da expressão gênica, como os miRNAs, possam estar relacionados com alterações na resposta aos medicamentos (Rukov; Shomron, 2011).

Atualmente, grande parte dos estudos associam os miRNAs com a resposta ao tratamento quimioterápico do câncer. Pane e colaboradores (2009) demonstraram que níveis da proteína BCRP/ABCG2, relacionada com a farmacocinética de alguns fármacos, estão intimamente ligados com a regulação de hsa-miR-328 em células de câncer de mama, alterando a sensibilidade à mitoxantrona. Do mesmo modo, Moriyama e colaboradores (2009) puderam observar que hsa-miR-21 está relacionado com a proliferação das células e com a resistência à gemcitabina no câncer de pâncreas.

Nesse contexto, foram realizadas algumas pesquisas envolvendo o efeito dos miRNAs na regulação das enzimas responsáveis pela metabolização de variados fármacos e, dentre elas, incluem-se aquelas pertencentes ao citocromo P450 (Glubb e Innocenti, 2011). Zhu e colaboradores (2008) observaram que determinadas células cancerígenas multirresistentes a drogas apresentaram expressão elevada de hsa-miR-27a e de hsa-miR-451 quando comparadas com células normais e que esses mesmos miRNAs estavam envolvidos com o aumento da expressão de ABCB1 que codifica a glicoproteína P (P-gp).

Na população, diferentes valores de expressão de CYP3A4 são encontrados, podendo alcançar variações de até 50% que nem sempre a presença de polimorfismos explica. Isto remeteu à busca de explicação levando à descoberta do hsa-miR-148a como um regulador indireto da expressão da enzima, que é encontrada principalmente no fígado. Essa descoberta foi evidenciada a partir da regulação de Receptor de Pregnano X (PXR), um dos principais fatores de transcrição de CYP3A4, pelo hsa-miR-148a em células do fígado. Este estudo demonstrou que um miRNA pode alterar a sensibilidade às drogas pela regulação indireta da expressão de proteínas metabolizadoras, bloqueando a expressão de seus fatores transcripcionais (Takagi et al., 2008).

As relações dos miRNAs com o bloqueio da expressão de RNAm de CYP3A4 também foram demonstradas por Pan e colaboradores (2009), os quais encontraram associação entre baixas expressões de RNAm de CYP3A4, e de sua respectiva proteína em células renais embrionárias, com altos níveis de hsa-miR-27b e hsa-miR-298. No mesmo estudo, interações entre hsa-miR-

298 com o receptor nuclear de vitamina D (VDR), que controla a transcrição de CYP3A4, sugerem também um controle indireto da expressão da enzima.

Levando-se em consideração o importante papel da reatividade plaquetária no desenvolvimento da trombose, Landry e colaboradores (2009) sugeriram que o receptor de ADP na superfície das plaquetas, P2Y12, importante no processo de ativação plaquetária, pudesse ter sua expressão controlada pela ligação de hsa-miR-223 à região 3' UTR de seu RNAm, presente nas plaquetas.

Kondkar e colaboradores (2010) mostraram que determinados miRNAs, como o hsa-miR-96, regulam também a expressão de proteínas essenciais para o processo de secreção de grânulos plaquetários, que levam conseqüentemente à ativação de outras plaquetas, como a Proteína de Membrana Associada à Vesícula-8 (VAMP8), a qual mostrou-se mais expressa em indivíduos com maior reatividade plaquetária (Kondkar *et al.*, 2010).

Recentemente foi descoberto que o receptor de ADP pode estar presente também em leucócitos, assim como em células musculares lisas vasculares, o que pode sugerir um papel desse receptor no desenvolvimento da inflamação e de doenças vasculares (Gachet, 2012).

No entanto, o perfil miRNômico de pacientes pode ser alterado na farmacoterapia. Foi observado que a utilização dos antiplaquetários AAS e prasugrel, assim como de clopidogrel, pode resultar na alteração da expressão de miRNAs, os quais podem ser detectados no plasma dos pacientes a partir

de métodos como a qPCR (Willeit *et al.*, 2013). Esse foi o primeiro estudo a identificar miRNAs responsivos à terapia com antiagregantes plaquetários.

Por fim, obtendo-se evidências de que o uso de diferentes medicamentos pode influenciar no perfil de miRNAs em diferentes células e tecidos (Rodrigues *et al.*, 2011) e que a caracterização do perfil de miRNAs possa ser mais acurada e específica do que o estudo de expressão de RNAm (Lu *et al.*, 2005; Schöler *et al.*, 2010), o presente projeto foi desenvolvido pela necessidade de se esclarecer melhor o papel dos miRNAs na ativação e agregação plaquetárias, assim como na resposta à ação antiagregante do AAS e do clopidogrel.

Considerando o potencial da associação entre a farmacogenética com o perfil de miRNAs, poderia-se resultar em novas estratégias terapêuticas e no esclarecimento da resistência ao tratamento da DAC. Com isso, o presente projeto tem como proposta utilizar as ferramentas do sequenciamento de última geração (NGS) para avaliar a relação existente entre o perfil de miRNAs de pacientes com DAC e a resposta antiagregante, assim como possibilitar a descoberta de novos miRNAs que possam estar envolvidos nos eventos cardiovasculares e na resposta terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de miRNAs no sangue periférico de indivíduos com DAC e sua relação com a resposta à dupla terapia de antiagregação.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a associação dos parâmetros clínicos e laboratoriais com a resposta ao AAS e clopidogrel;
- Avaliar a associação da expressão de miRNAs com a resposta aos antiagregantes plaquetários AAS e clopidogrel;
- Analisar as vias moleculares dos principais miRNAs diferentemente expressos e identificar possíveis alvos que possam estar relacionados com agregação, ativação plaquetária e metabolismo dos antiplaquetários;
- Associar o perfil de expressão dos principais miRNAs com os parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com DAC.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram selecionados no Setor de Hemodinâmica do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), previamente à realização da angioplastia, 128 indivíduos de ambos os sexos com idade entre 30 e 80 anos apresentando:

- Sintomas ou sinais de isquemia do miocárdio, com lesões ateromatosas de, no mínimo, 50%, as quais devem ser expressas em relação ao diâmetro do vaso sadio no segmento próximo à lesão, geralmente detectadas por estimação angiográfica automática quantitativa, a qual utiliza contrastes iodados, os quais se difundem pelo sistema vascular, evidenciando as dimensões do vaso, perfusão tecidual e a extensão da lesão (Mattos *et al.*, 2008);
- Dose de ataque 300mg de clopidogrel nas 24h anteriores à angioplastia com dose de manutenção de 100mg de AAS diárias ou doses diárias de 75mg de clopidogrel nos últimos 5 dias anteriores à angioplastia e de 100mg de AAS diárias (Nicolau *et al.*, 2007; Piegas *et al.*, 2009).

Dois pacientes foram excluídos do projeto por não ter sido possível obter amostra suficiente para análise da agregação plaquetária. Dados referentes às informações relacionadas a fatores de risco para DAC como diabetes, hipertensão, histórico familiar de doença aterosclerótica, dislipidemia, hábito de fumar, consumo de bebidas alcoólicas, prática de exercícios físicos, peso e altura foram obtidos através de questionário realizado no momento da assinatura do termo de consentimento.

3.1.1 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo indivíduos que apresentaram quaisquer das seguintes condições:

- Contra-indicação para o uso de AAS ou clopidogrel;
- Insuficiência renal crônica;
- Insuficiência hepática;
- Insuficiência respiratória;
- Doenças hemorrágicas;
- Doenças endócrinas;
- Neoplasias;
- Hipercolesterolemia familiar conhecida ou presente em membros da família;
- Uso de anticoagulantes orais e/ou antagonistas GPIIb/IIIa;
- Uso de drogas ilícitas.

3.2 Amostra biológica

Foram obtidas amostras de sangue total, anticoaguladas ou não, coletadas por punção da veia antecubital utilizando-se o sistema de coleta à vácuo. As coletas foram realizadas no setor de Hemodinâmica do IDPC, sob supervisão da equipe médica pertencente ao grupo multidisciplinar de estudos sobre aterosclerose.

A obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido e a coleta das amostras dos pacientes foram realizadas anteriormente ao procedimento de angioplastia. Foram coletados: 1 tubo de 3,5mL contendo anticoagulante citrato

de sódio 3,2% para a determinação de fibrinogênio; 1 tubo de 3mL contendo anticoagulante hirudina para a determinação da agregação plaquetária; 3 tubos de 2,5 mL com conservante de RNA (Paxgene™); 1 tubo de 5mL sem anticoagulante para dosagens bioquímicas e atividades enzimáticas; 1 tubo de 4mL, contendo anticoagulante EDTA, para análise de leucograma, hemograma e contagem de plaquetas (figura 6).

Todos os tubos de coleta foram do sistema de vácuo *Vacutainer™* (*Becton Dickinson Company*, Plymouth, Reino Unido), e utilizou-se o modelo *PAXgene™* para a coleta do RNA do sangue total (*Preanalytix GmbH*, Hombrechtikon, CH).

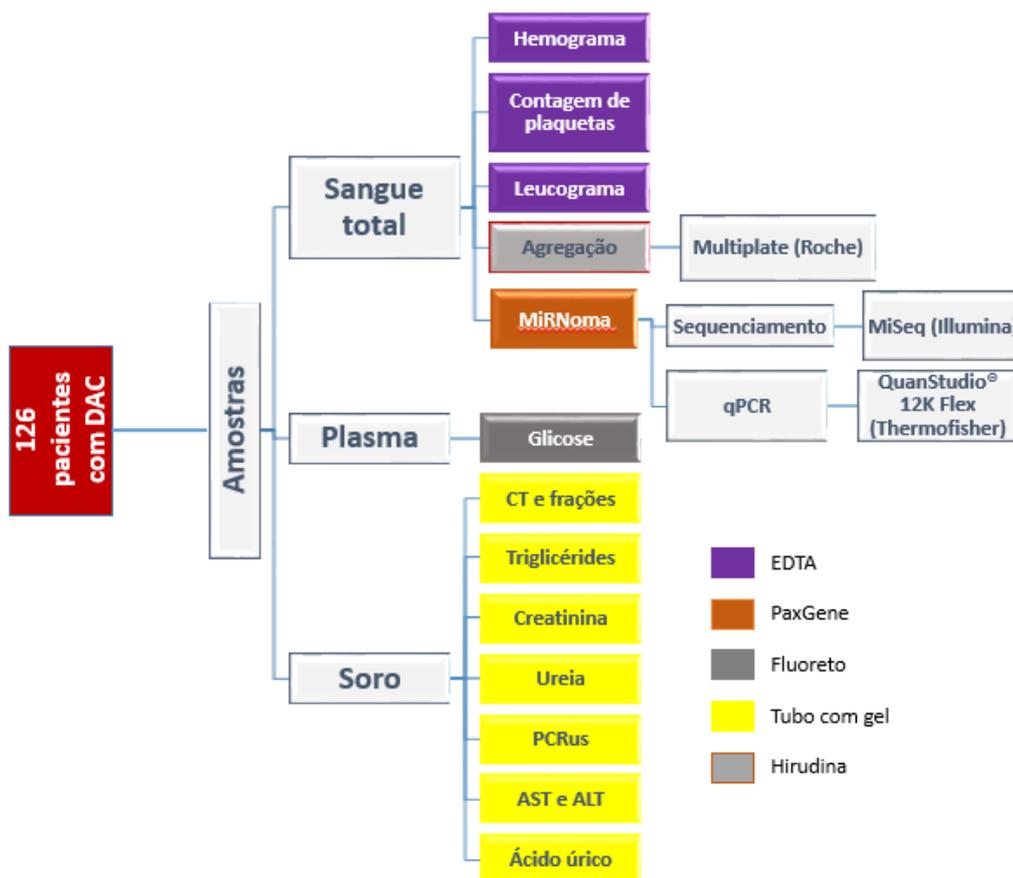


Figura 6. Fluxograma de coleta com a identificação das subsequentes análises realizadas em cada tipo de tubo. CT, Colesterol total; PCRus, Proteína C-reativa ultrasensível; qPCR, Reação em cadeia da polimerase quantitativa.

3.3 Determinações laboratoriais

Para realização da análise do hemograma, do leucograma e do plaquetograma foram utilizados os métodos citoquímico/isovolumétrico ou de impedância automatizados nos equipamentos *ABX Pentra 120* (ABX, Kyoto, Japão) e *ABX Pentra 80* (ABX, Kyoto, Japão).

Para a análise da atividade de aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) e para as dosagens de glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, colesterol total, colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDLc) e triglicérides (TG) foram utilizados os métodos colorimétricos e enzimáticos automatizados nos equipamentos *Dimension[®] RXL* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, EUA) e *XPAND* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, EUA). O colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDLc) e da lipoproteína de baixa densidade (LDLc) foram calculados segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (Friedewald, Levy e Fredrickson, 1972).

Para dosagens da proteína C-reativa ultrasensível (PCRus) foi utilizado o método de imunensaio-turbidimétrico automatizado, com leitura no aparelho Hitachi-modelo 912 (Myco instrumentation, Renton, WA). Esses exames laboratoriais foram realizados pelo IDPC, no laboratório da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP).

3.4 Determinação da taxa de inibição de agregação plaquetária

No dia da realização da revascularização percutânea e implantação do *stent* foram determinadas as taxas específicas de inibição da agregação plaquetária referentes a cada medicamento (AAS e clopidogrel). A partir desses resultados, os pacientes foram estratificados em tercís de acordo com a

resposta aos antiagregantes. O modelo do estudo levou em consideração a comparação dos valores extremos de agregação, representados pelos tercís 1 e 3 (T1 e T3, respectivamente), sendo que o teste de agregação foi determinante para as análises estatísticas subsequentes e para a escolha dos pacientes a terem suas amostras sequenciadas para análise do perfil de expressão de miRNAs (figura 7).



Figura 7. Fluxograma da divisão dos pacientes em tercís de resposta. T1, Tercil 1 de resposta, que compreende os pacientes classificados como respondedores. T2, Tercil 2 de resposta; T3, Tercil 3 de resposta, que compreende os pacientes classificados como não respondedores.

A agregação plaquetária foi determinada pelo sistema qualitativo *Multiplate® Analyzer* (Roche, Basel, Suíça), de acordo com instruções do fabricante. Este sistema tem como base a medida da impedância elétrica em dois eletrodos após indução da agregação. A especificidade da inibição da via de agregação pelo AAS ou pelo clopidogrel é possível através da utilização de agonistas plaquetários específicos para cada fármaco, como o ácido araquidônico e o ADP, respectivamente. Como controle foi utilizado o

TRAPteste, que contém o Peptídeo Ativador do Receptor de Trombina (TRAP), uma via não inibida pelos antiagregantes em estudo (**figura 8**).

As análises da inibição da agregação plaquetária foram realizadas em um intervalo não superior a 4 horas no Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (LIMC-IDPC).

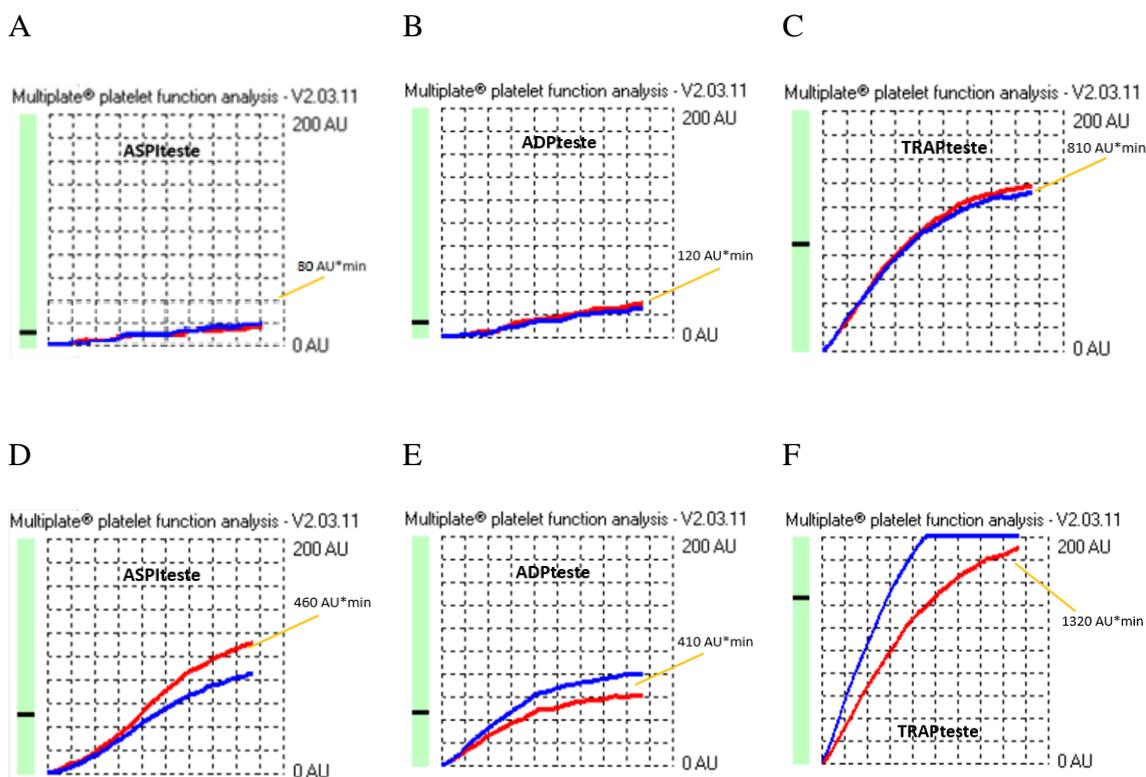


Figura 8. Perfil da taxa de agregação plaquetária de pacientes dos grupos T1 (A, B, C) e T3 (D, E, F). A análise foi realizada em duplicata pelo próprio equipamento (curvas azul e vermelha) e o resultado é a média da taxa de agregação das duas curvas, em AU*min. ADPtteste, teste de agregação que tem como agonista o ADP e avalia a resposta frente ao clopidogrel; ASPtteste, teste de agregação que tem como agonista o ácido araquidônico e avalia a resposta ao AAS; AU*min, Unidades de agregação por minuto; TRAPtteste, teste de agregação que utiliza o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) como agonista de uma via não bloqueada pelos antiagregantes em uso, a qual serve como controle.

3.5 Extração de miRNA

Para a extração do RNA total das células do sangue total, incluindo a fração de miRNAs, foi utilizado o protocolo do kit para extração de RNA total do sangue *PAXgene™* (Preanalytix GmbH, Hombrechtikon, CH). A quantificação e pureza dos miRNAs obtidos do sangue total foram realizadas utilizando-se o

fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o *Nanodrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies, Inc.*, Wilmington, EUA), respectivamente.

A integridade do RNA total obtido das células do sangue total foi avaliada utilizando-se o equipamento *Bioanalyzer*, da plataforma *Agilent* (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, EUA) e o *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, EUA). No controle de qualidade para o sequenciamento, apenas amostras com integridade de RNA (RIN) igual ou acima de 8,0 poderiam ser validadas. Para a análise de qPCR, o valor aceito foi de $RIN \geq 6,0$ (Fleige e Pfaffl, 2006).

3.6 Preparo das bibliotecas de miRNA

Para a construção da biblioteca de cDNA do sangue total dos pacientes foi utilizado o kit de preparação de amostras de pequenos RNAs *TruSeq* (Illumina, Inc. San Diego, EUA), seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. Ao todo foram selecionadas 12 amostras de sangue total para serem sequenciadas, 6 delas de pacientes pertencentes ao primeiro tercil de resposta aos antiagregantes AAS e clopidogrel e as outras 6 amostras referentes a pacientes do terceiro tercil. O equivalente a 1µg de RNA total de cada amostra selecionada foi ligado a adaptadores nas extremidades 3' e 5' pela RNA Ligase T4 e, em seguida, o produto de ligação foi convertido em cDNA utilizando-se a enzima de transcrição reversa *SuperScript II* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O cDNA foi amplificado pela reação em cadeia pela polimerase e o produto de amplificação foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. O fragmento de aproximadamente 147pb, correspondente aos fragmentos de miRNA maduro de aproximadamente 22 nucleotídeos com

os adaptadores, foi purificado do gel por centrifugação em filtro de 5um (**figura 9**).

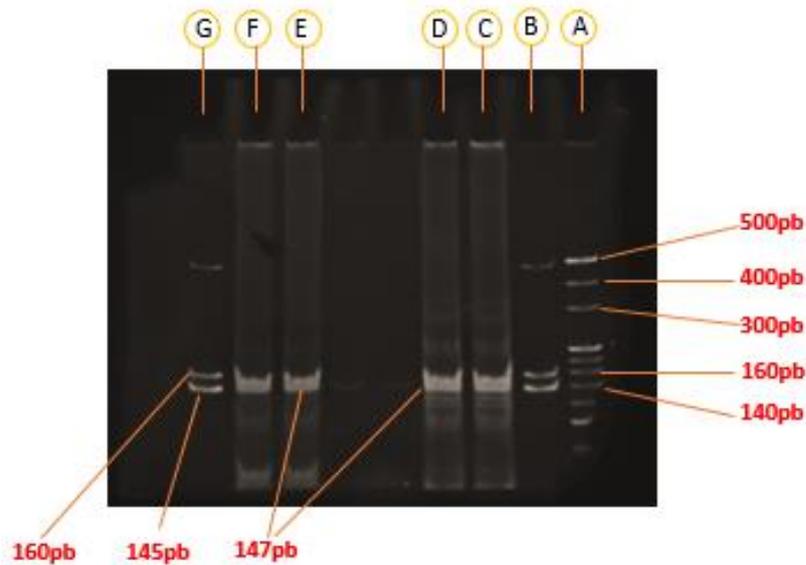
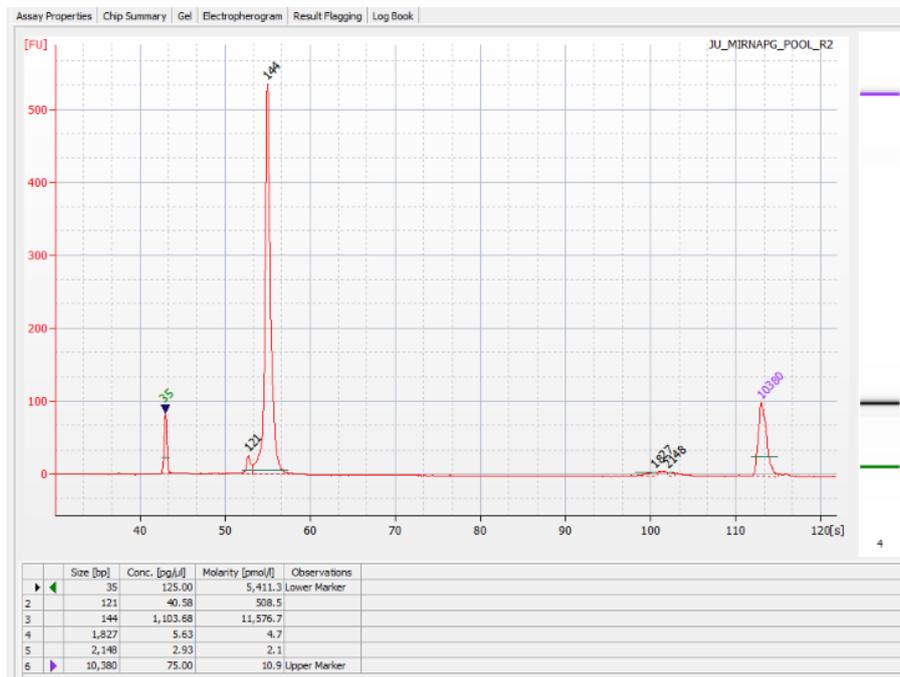


Figura 9. Fotografia do gel 6% de poliacrilamida (1mm) mostrando o fragmento correspondente aos miRNAs ligados aos adaptadores (147pb). A, marcador de alta resolução; B, G, marcador das bandas 145pb, 160pb e 500pb; C, D, fragmentos correspondentes à biblioteca dos pacientes não respondedores (tercil 3); E, F, fragmentos correspondentes à biblioteca dos pacientes respondedores (tercil 1).

A pureza dos fragmentos, o tamanho e a concentração foram analisados utilizando-se o equipamento *Bioanalyzer 2100* e a plataforma *Agilent* (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, EUA), assim como os microcapilares para análise de DNA de alta sensibilidade da *Agilent* (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, EUA) (**figura 10**).

A



B

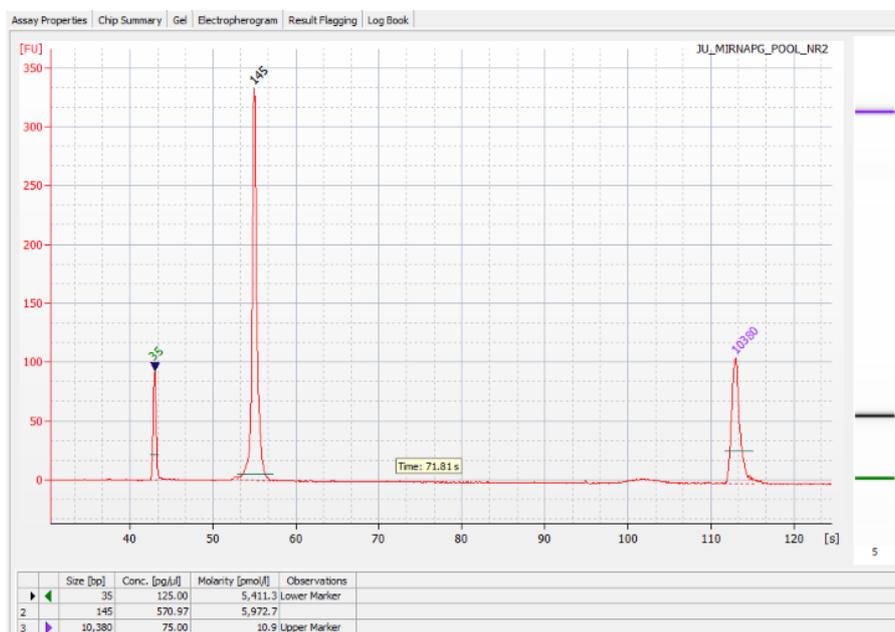


Figura 10. Gráficos de eletroforese em microcapilares para análise de DNA de alta sensibilidade obtidos pelo equipamento *Bioanalyzer 2100* da *Agilent*. A figura ilustra os fragmentos de miRNA purificados do gel de poliacrilamida 6%. A, *Pool* de amostras de cDNA que correspondem às amostras dos pacientes pertencentes ao primeiro tercil (respondedores), com 144pb; B, *Pool* de amostras de cDNA dos pacientes pertencentes ao terceiro tercil (não respondedores), com 145pb. Os fragmentos restantes correspondem a marcadores de alto (10380 pares de bases) e baixo peso molecular (35 pares de bases).

Em seguida, as amostras de cDNA foram preparadas para o sequenciamento utilizando-se o kit V2 de reagentes *MiSeq*® (Illumina, Inc. San Diego, USA), e cada biblioteca seguiu para o sequenciamento com uma concentração de 12pM.

3.7 Sequenciamento e análise dos dados

3.7.1 Sequenciamento por síntese

As amostras foram sequenciadas no equipamento *MiSeq*® (Illumina Inc. San Diego, EUA). A plataforma *Illumina* (Illumina, 2010) realiza o sequenciamento através de uma técnica denominada 'sequenciamento por síntese' (SBS). A primeira etapa baseia-se na formação de agrupamentos pela amplificação 'em ponte' das sequências com os adaptadores com o objetivo de possibilitar a detecção do sinal de fluorescência no sequenciamento.

Após a adição da biblioteca na célula de fluxo (*flow cell*), as sequências de miRNAs hibridizam-se a duas sequências de oligonucleotídeos contidas na célula de fluxo, os quais são complementares a cada um dos adaptadores ligados a esses miRNAs (adaptadores 5' e 3'). Essa hibridização acontece ao acaso. Com a adição de polimerase e de deoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) ao meio, sequências complementares aos fragmentos originais, as quais terão a direção 5'→3', são formadas. As sequências originais são retiradas do meio através de uma etapa de desnaturação e lavagem. A fita complementar hibridiza-se, então, com o oligo adjacente através da formação de 'pontes'. Com a adição de polimerase e de dNTPs, sequências idênticas às originais são formadas. Outra etapa de desnaturação e de lavagem retiram as

sequências reversas do meio, só restando as sequências originais linearizadas. Essas então são bloqueadas na última etapa de agrupamento para que não formem mais pontes e, conseqüentemente, não sejam mais amplificadas. Os oligonucleotídeos livres da célula de fluxo também são bloqueados. Por fim, haverá múltiplas cópias do DNA original formando agrupamentos, os quais são grupos de diferentes fragmentos de DNA da amostra original amplificados. O *primer* de sequenciamento é então hibridizado às sequências agrupadas.

A etapa de sequenciamento inicia-se com a adição de dNTPs e de polimerases ao meio. Esses dNTPs são modificados e possuem marcadores de fluorescência diferentes, e apenas um único dNTP é adicionado por ciclo em cada sequência. Portanto, cada nucleotídeo adicionado é reconhecido a partir da fluorescência que emite. A cada adição de nucleotídeo, detecção de sinal, remoção de fluorescência - com conseqüente desbloqueio de nucleotídeo incorporado - é dada a denominação 'ciclo'. A quantidade de ciclos do sequenciamento relaciona-se, então, com o tamanho do fragmento a ser sequenciado. No caso dos miRNAs, são utilizados *kits* de 50 ciclos.

3.7.2 Análise de dados

A análise primária dos resultados de sequenciamento foi realizada pelo *software* de Análise em Tempo Real (RTA) do equipamento *MiSeq* e as análises secundárias, que avaliam a qualidade do sequenciamento, foram realizadas pelo *software* *MiSeq Reporter*, juntamente com o *software* *CLC Genomics Workbench* versão 5.5 (<http://www.clcbio.com/genomics/>).

Após alinhamento das sequências pelo CLC, utilizando-se como referência o banco de dados do miRBase versão 20.0

(<http://www.miRBase.org/>) para *Homo sapiens*, as amostras foram adequadas para o tamanho mínimo de miRNAs (15pb), retirando-se sequências com tamanhos menores, e contadas. Na anotação e contagem, foram permitidos dois *mismatches* por sequência, duas bases a mais e a menos, e um mínimo de contagem igual a 1, de acordo com os parâmetros padronizados pelo *software*.

Para a análise dos miRNAs diferentemente expressos, foi utilizado o pacote *Deseq2* (Love, Huber e Anders, 2014) do *software* Bioconductor. Foram considerados miRNAs diferentemente expressos aqueles que se apresentaram com uma diferença de expressão $\geq 1,5X$ no grupo T3 em relação ao grupo T1.

Os alvos dos miRNAs diferentemente expressos foram identificados através da utilização do *software* *Ingenuity*®, o qual reconhece os miRNAs através do banco de dados do *miRBase* e identifica os alvos através da sequência *seed* de cada miRNA, baseando-se nos bancos de dados *TargetScan* e *TarBase* e no seu próprio banco de dados de referências (*Ingenuity Expert Findings*). Os filtros utilizados para a pesquisa de alvos foram: doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, resposta inflamatória e plaquetas.

3.8 Confirmação pela qPCR

Os miRNAs diferentemente expressos seguiram para confirmação pela qPCR utilizando-se o kit de transcrição reversa *Miscript II* juntamente com o kit de PCR *Sybr® Green*, placas customizadas de PCR *array* de 384 poços para miRNAs (Qiagen, Hilden, Alemanha) e o equipamento QuantStudio 12K Flex (*Applied Biosystems*, Waltham, EUA). Em cada poço das placas de PCR *array*

customizadas foram adicionados 5uL de *Sybr® Green Master Mix 2X*, 1uL de cDNA, 3uL de água ultrapura e 1uL de *primer universal Mispript 10X*, de acordo com especificações do fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A análise da expressão gênica foi realizada pela quantificação relativa, utilizando-se como controles endógenos os pequenos RNAs nucleolares snord61, snord68, snord95 e RNU6-6P para a normalização dos valores de expressão dos miRNAs nas células do sangue total. Para a obtenção dos valores de expressão foi utilizada a fórmula $2^{\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct =$ média de Ct dos controles endógenos – Ct do miRNA.

3.9 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos até o momento foram analisados através do programa estatístico SPSS versão 20.0 para *Windows (IBM® Corporation, Somers, EUA)*. A distribuição dos resultados de agregação plaquetária em tercis de resposta ao AAS e ao clopidogrel neste estudo foi obtida pela análise no programa SPSS, baseando-se em estudos realizados por Luchessi e colaboradores (2012).

Para a construção dos gráficos foi utilizado o programa *GraphPad Prism®*, versão 5.0 (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA*) e o *software* SPSS versão 20.0. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos valores descritivos para o valor de p foram inferiores a 5% ($p < 0,05$). Para as análises de normalidade das variáveis contínuas foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Variáveis contínuas com distribuição normal foram analisadas posteriormente pelos testes ANOVA ou teste T, com teste de

correlação de Pearson, enquanto que as variáveis contínuas sem distribuição normal foram então avaliadas pelo teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, com teste de correlação de Spearman. Para as variáveis categóricas foi realizado o teste exato de Fisher. A influência das variáveis categóricas e numéricas sobre os valores da taxa de agregação plaquetária foi avaliada pelo teste de regressão logística binária univariada e multivariada, utilizando-se os métodos *Enter* e *Backward*, respectivamente (figura 11).

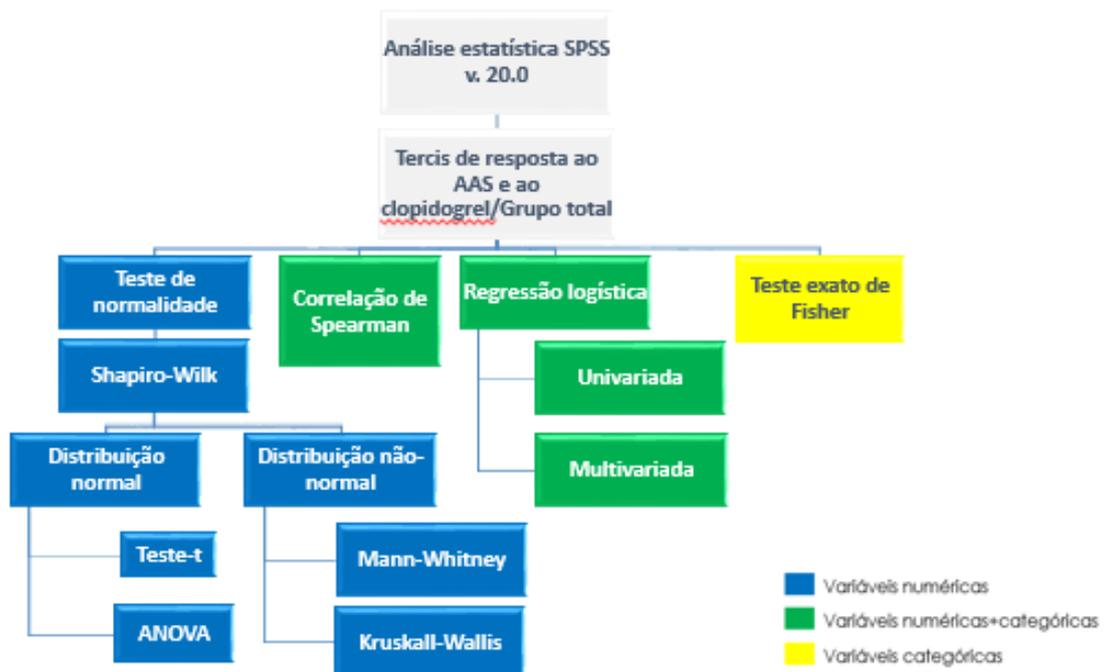


Figura 11. Fluxograma da análise estatística.

4 RESULTADOS

4.1 Dados biodemográficos e características clínico-laboratoriais dos pacientes

Os dados biodemográficos e as características clínico-laboratoriais em relação à resposta antiagregante ao AAS e ao clopidogrel estão apresentados nas tabelas 1 e 8. A distribuição dos dados biodemográficos e das características clínico-laboratoriais foram feitas em tercís através dos resultados da análise de agregação plaquetária em resposta ao AAS e clopidogrel, como descrito na seção 3, com o intuito de se comparar valores extremos de agregação. Sendo assim, pacientes categorizados no T1 de resposta foram classificados como respondedores e pacientes categorizados no T3 foram classificados como não respondedores (**figura 12**).

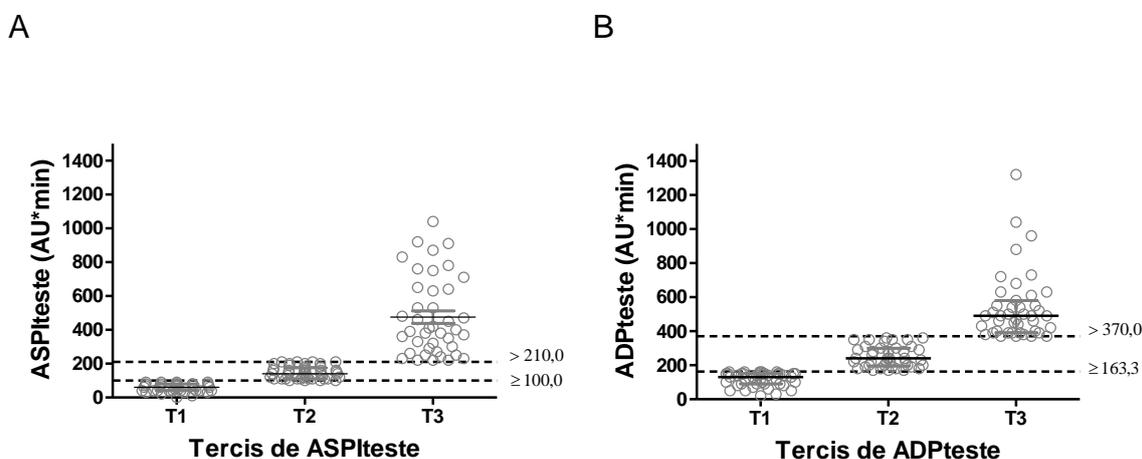


Figura 12. Tercis de resposta aos antiagregantes AAS (A) e clopidogrel (B). As barras de erro apresentam os valores de mediana e intervalo interquartilico 25%-75%. ADPteste: teste de agregação plaquetária que emprega o difosfato de adenosina (ADP) com agonista para avaliar resposta ao clopidogrel; ASPIteste: teste de agregação plaquetária que emprega o ácido araquidônico com agonista para avaliar resposta ao AAS.

4.1.1 Dados biodemográficos e características clínico-laboratoriais dos pacientes em relação aos tercís de resposta ao AAS

De acordo com os resultados, pôde-se observar que houve diferente distribuição dos pacientes de acordo com o sexo entre os tercís de resposta ao antiagregante AAS ($p=0,030$). Houve mais pacientes do sexo masculino do que do sexo feminino em todos os tercís (**figura 13A**). Foi observado, também, que pacientes com histórico de DAC apresentaram-se diferentemente distribuídos entre os tercís de resposta ao AAS ($p=0,026$), onde o T3 apresentou o menor número de pacientes com histórico familiar da doença (**figura 13B**).

Tabela 1 Características clínico-laboratoriais e dados biodemográficos dos pacientes em relação aos tercís de resposta ao AAS

	Total 100% (126)	Tercil de resposta ao AAS			p
		T1 (n=40)	T2 (n=45)	T3 (n=41)	
Características Clínicas					
Idade, anos	60 (54-67)	59 (52-64)	60 (57-67)	59 (54-68)	0,626
IMC, Kg/m ²	26,8 (24,5-29,6)	26,4 (24,3-29,8)	27,3 (24,5-29,0)	26,9 (25,4-30,5)	0,711
Sexo masculino	77,8 (98)	26,5 (26)	40,8 (40)	32,7 (32)	0,031
feminino	22,2 (28)	50,0 (14)	17,9 (5)	32,1 (9)	
Fumantes ativos	21,4 (27)	33,3 (9)	29,6 (8)	37,0 (10)	0,739
Consumo de álcool	18,4 (23)	30,4 (7)	47,8 (11)	21,7 (5)	0,322
Prática de exercício	16,1 (20)	20,0 (4)	45,0 (9)	35,0 (7)	0,423
Diabéticos	36,8 (46)	34,8 (16)	28,3 (13)	37,0 (17)	0,384
Hipertensos	81,6 (102)	31,4 (32)	33,3 (34)	35,3 (36)	0,423
Dislipidêmicos	75,2 (94)	35,1 (33)	35,1 (33)	29,8 (28)	0,326
Histórico de DAC	45,6 (57)	31,6 (18)	47,4 (27)	21,1 (12)	0,027
HUDC (h)	16,0 (11-19)	16,0 (12,0-19,0)	16,0 (4,6-18,0)	15,5 (11,3-19,5)	0,735
HUDA (h)	18,0 (16-19,5)	18,5 (16,0-20,0)	18,0 (17,0-19,5)	18,0 (13,0-19,0)	0,684
Nº angioplastias anteriores					
0	11,9 (15)	13,3 (20)	40,0 (6)	46,7 (7)	0,430
1	63,5 (80)	33,8 (27)	37,5 (30)	28,7 (23)	
2 ou mais	24,6 (31)	35,5 (11)	29,90 (9)	35,5 (11)	
Diagnóstico^F					
Assintomático	37,6 (47)	21,3 (10)	44,7 (21)	34,0 (16)	0,261
Angina estável	58,5 (73)	37,0 (27)	30,1 (22)	32,9 (24)	
SCA sem supra	3,2 (4)	50,0 (2)	25,0 (1)	25,0 (1)	
SCA com supra	0,8 (1)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	

Uso de**Medicamentos**

Beta-bloqueadores	85,5 (106)	31,1 (33)	35,8 (38)	33,0 (35)	1,000
Inibidores da ECA	56,5 (70)	28,6 (20)	38,6 (27)	32,9 (23)	0,786
Estatinas	94,4 (117)	32,6 (37)	35,9 (42)	32,5 (38)	0,702
Inibidores de prótons	16,1 (20)	30,0 (6)	45,0 (9)	25,0 (5)	0,648

Exames**Laboratoriais**

Hb, g/dL	14,2(13,1-15,1)	14,1 (13,3-14,9)	13,9 (12,8-14,9)	14,4 (13,4-15,3)	0,776
Hematócrito	42,2(40,3-44,4)	42,3 (40,6-44,3)	41,6 (39,2-43,9)	43,2 (40,7-44,8)	0,627
Leucócitos, 10 ³ /uL	6700 (5670-7900)	6700(5570-7470)	6130(5670-7740)	6910(6060-8490)	0,464
Plaquetas, 10 ³ /uL	244 (197-290)	248 (196-308)	235 (199-265)	241 (194-271)	0,533
PCRus, mg/L	0,4 (0,2-1,0)	0,6 (0,2-1,0) ^{a, b}	0,2 (0,1-0,7) ^a	0,6 (0,3-1,3) ^b	0,008
Fibrinogênio, mg/dL	334(289,3-391,2)	310,5 (277,0-360,7) ^a	329,9 (274,0-390,5) ^{a, b}	376,8 (298,5-414,0) ^b	0,022
Glicose, mg/dL	101 (93-121)	101 (92-140)	100 (91-144)	108 (92-216)	0,541
Creatinina, mg/dL	0,9 (0,7-1,0)	0,8 (0,7-1,0)	0,9 (0,8-1,0)	0,9 (0,7-1,0)	0,486
AST, UL	24 (20-30)	26 (20-33)	23 (19-29)	23 (19-25)	0,066
ALT, UL	36 (29-43)	38 (32-46)	35 (29-45)	33 (29-41)	0,383
Triglicérides, mg/dL	128 (96-188)	151 (99-210)	119 (88-184)	124 (98-177)	0,300
Colesterol total, mg/dL	167 (141-191)	168 (143-204)	166 (142-191)	166 (141-181)	0,657
HDLc, mg/dL	41 (35-47)	42 (36-49)	43 (37-50)	39 (34-43)	0,084
LDLc, mg/dL	91 (75-120)	100 (78-120)	88 (71-121)	89 (74-119)	0,486
VLDLc, mg/dL	25 (19-36)	30 (20-41)	24 (18-34)	25 (19-35)	0,272
Ácido úrico,	5,2 (4,2-6,0)	4,8 (4,1-6,0)	5,3 (4,5-5,8)	5,3 (3,9-6,0)	0,531
ADPteste, UA*min	240 (150-400)	150 (110-260) ^a	220 (160-370) ^b	390 (300-520) ^c	<0,001
ASPIteste, UA*min	140 (80-270)	60 (40-80) ^a	140 (110-170) ^b	400 (290-640) ^c	<0,001
TRAPteste, UA*min	975 (790-1230)	880 (670-1165)	920 (730-1200)	1130 (970-1250)	0,098

Os dados estão expressos em mediana (percentil 25%-percentil 75%) ou porcentagem (número de pacientes). A categorização dos pacientes foi realizada através da distribuição em tercís, de acordo com o valor de unidade de agregação plaquetária de ASPIteste e baseados do estudo de Luchessi e colaboradores (2012). O valor de *p* (*P*) foi determinado pelos testes Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ou ANOVA com pós-teste de Tukey para as variáveis contínuas e pelo teste exato de Fisher para as variáveis categóricas. ADPteste: teste de agregação plaquetária que emprega o difosfato de adenosina (ADP) como agonista para avaliar resposta ao clopidogrel; ALT, Alanina Transaminase; ASPIteste: teste de agregação plaquetária que emprega o ácido araquidônico como agonista para avaliar resposta ao AAS; AST, Aspartato Transaminase; DAC, Doença Arterial Coronariana; Hb, Hemoglobina; HDLc, colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade; HUDA, Horário da Última Dose de AAS; HUDC, Horário da Última Dose de Clopidogrel; IMC, Índice de Massa Corpórea; LDLc, colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade; PCRus, Proteína C Reativa ultrasensível; SCA com supra, Síndrome Coronariana Aguda com supradesnivelamento do segmento ST; SCA sem supra, Síndrome Coronariana Aguda sem supradesnivelamento do segmento ST; TRAPteste, teste de agregação plaquetária que emprega o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) como agonista para verificar resposta na via da trombina; UA*min, Unidades de agregação por minuto; VLDLc, colesterol da Lipoproteína de Muito Baixa Densidade. ^{a, b, c}Letras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas (*p*<0,05) entre os grupos. [†]Diagnóstico do paciente no momento em que foi encaminhado para o procedimento de angioplastia.

Em relação às variáveis contínuas, houve associação dos valores de PCRus e fibrinogênio, assim como de ADPteste, com os tercís de resposta ao AAS (tabela 1).

Para avaliar se as variáveis laboratoriais que apresentaram associação com os tercís de resposta ao AAS possuem correlação com os valores de

ASPIteste, foi realizado o teste de correlação de Spearman, no qual observou-se que houve uma correlação positiva, embora pequena, dos valores de ASPIteste com os valores de fibrinogênio ($r=0,232$, $p=0,009$). Ao mesmo tempo, pôde-se observar uma correlação moderada positiva com os valores de ADPteste ($r=0,505$; $p<0,001$). Por outro lado, houve uma tendência de correlação entre os valores de PCRus e ASPIteste ($r=0,546$; $p=0,055$) (tabela 2, figura 14).

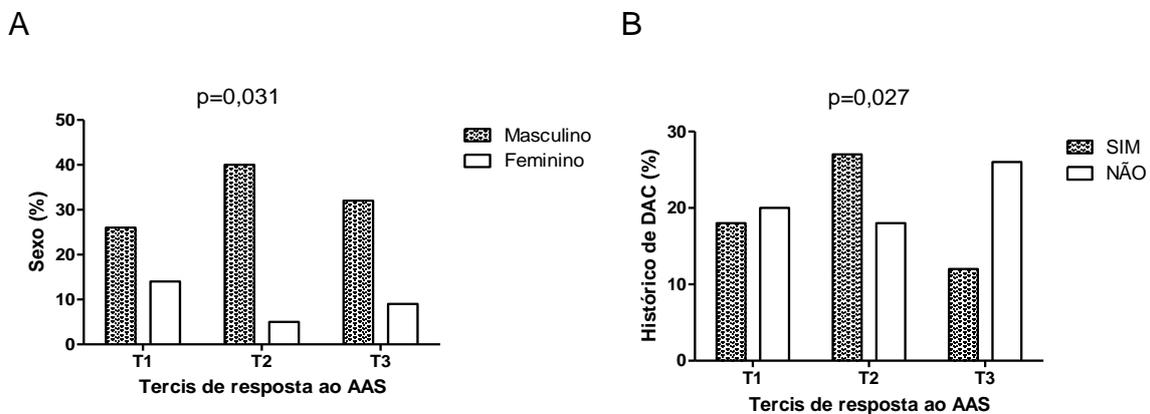
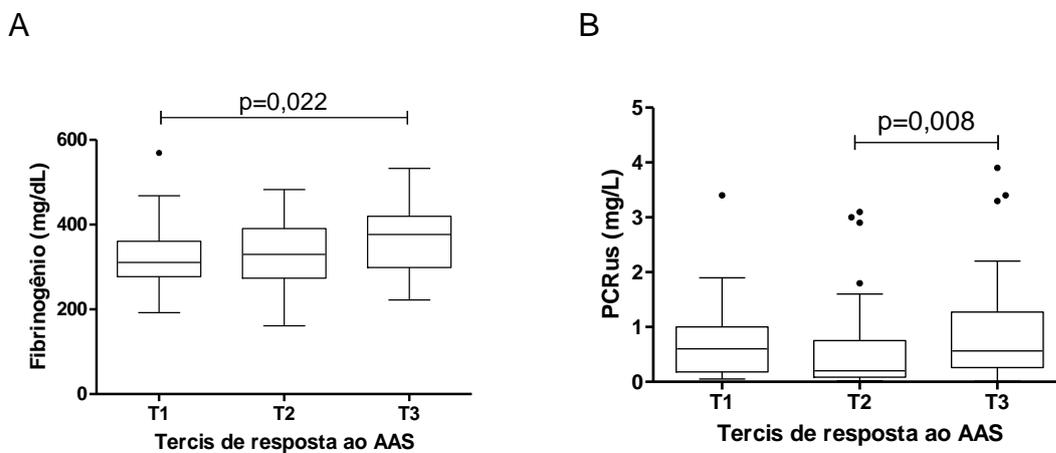


Figura 13. Gráficos representando a distribuição das categorias das variáveis qualitativas entre os tercios de ASPIteste. A, Distribuição dos pacientes entre os tercios de ASPIteste de acordo com o sexo; B, Distribuição dos pacientes entre os tercios de ASPIteste de acordo com o histórico de DAC. Para a análise foi utilizado o teste exato de Fisher. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p<0,05$. ASPIteste, teste de agregação plaquetária que utiliza o ácido araquidônico como agonista para avaliar resposta ao AAS; DAC, Doença Arterial Coronariana; UA*minuto, Unidades de agregação por minuto.



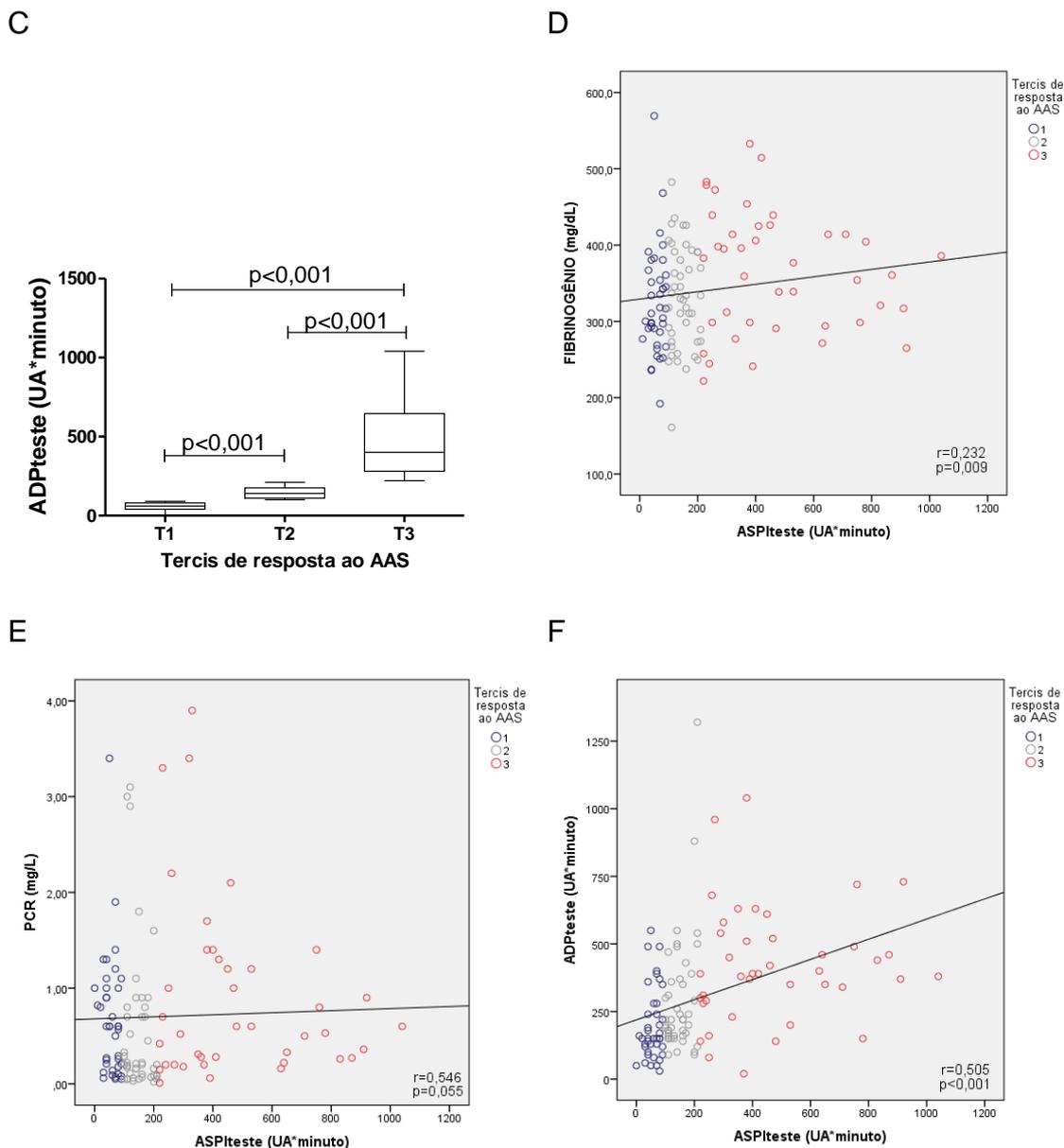


Figura 14. Gráfico de caixas com barras de erro no modelo Tukey e diagramas de dispersão demonstrando associação de variáveis laboratoriais com os valores de agregação em resposta ao AAS. A, Gráfico de caixas com barras de erro demonstrando a associação entre os valores de fibrinogênio e os tercís de resposta ao AAS; B, Gráfico de caixas com barras de erro mostrando a associação entre os valores de PCRus e os tercís de ASPIteste; C, Gráfico de caixas com barras de erro mostrando a associação dos valores de ADPteste com os tercís de resposta ao AAS; D, Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre os valores de fibrinogênio e os valores do teste de agregação plaquetária ASPIteste; E, Diagrama de dispersão mostrando a correlação das dosagens de PCRus com os valores de ASPIteste; F, Diagrama de dispersão mostrando a correlação entre os valores de ADPteste e os valores de ASPIteste. A análise estatística de associação foi realizada através do teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn, enquanto os testes de correlação foram obtidos a partir do teste de Spearman. PCRus, Proteína C-reativa ultrasensível. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os pontos escuros nos gráficos de caixa representam outliers.

Tabela 2. Correlação das variáveis laboratoriais com os valores de ASPIteste

Variável (n)	Coefficiente de correlação (r)	p
Fibrinogênio (125)	0,232	0,009
PCRus (124)	0,546	0,055
ADPteste (125)	0,505	<0,001

Para a análise dos dados foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ADPtteste, Teste de agregação plaquetária que utiliza o ADP como agonista e avalia resposta ao clopidogrel; DAC, Doença Arterial Coronariana; PCRus, Proteína C-reativa ultrasensível.

Ao analisar-se a influência que as variáveis clínicas e laboratoriais, os fatores de risco e os medicamentos concomitantemente administrados (variáveis independentes ou covariáveis) exercem sobre a classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS (variável dependente), utilizou-se a análise de regressão logística binária, com observação do ajustamento do modelo pelo teste de Hosmer e Lemeshow.

Pelo fato de todos os pacientes apresentarem DAC, uma doença complexa que possui vários fatores de risco, deu-se ênfase primeiramente à análise logística multivariada, a qual analisa as variáveis em conjunto, e não individualmente, para identificar a influência que elas exercem na classificação de resposta ao AAS quando na presença de outros fatores. Os fatores de risco, os medicamentos concomitantemente administrados e as variáveis clínicas e laboratoriais foram analisados primeiramente separadamente em modelos multivariados distintos.

Pôde-se observar que não houve influência dos medicamentos concomitantemente administrados na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS (**tabela 3**).

Tabela 3 Análise multivariada da influência dos medicamentos concomitantemente administrados na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS

Variáveis (n=124)	Odds Ratio	IC 95%	p
Beta-bloqueadores	1,009	0,340-2,998	0,987
Inibidores da ECA	1,000	0,462-2,162	0,999
Estatinas	0,687	0,144-3,280	0,637
Inibidores da bomba de prótons	0,647	0,215-1,941	0,437

Para análise dos dados foi realizada a análise de regressão logística binária multivariada com o método *Backward*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ECA, Enzima conversora de angiotensina; IC 95%, Intervalo de confiança de 95%.

Já dentre os fatores de risco, verificou-se que somente o histórico de DAC apresentou influência sobre a classificação dos pacientes como não respondedores. Com o ajuste do modelo para os outros fatores de risco, o histórico de DAC aumentou em quase 3 vezes as chances de um paciente obter valores de $ASPI_{teste} > 210,0 \text{UA} \cdot \text{minuto}$ (**tabela 4**).

Tabela 4 Análise multivariada da influência dos fatores de risco na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS

Variáveis (n=122)	Odds Ratio	IC 95%	p
Sexo	0,832	0,294-2,345	0,729
Obesidade	0,942	0,356-2,492	0,904
Fumo	0,892	0,305-2,612	0,824
Consumo de álcool	2,909	0,817-10,356	0,099
Inatividade física	0,635	0,202-2,001	0,438
Diabetes	0,728	0,299-1,770	0,483
Hipertensão	0,370	0,109-1,255	0,111
Dislipidemia	2,385	0,834-6,820	0,105
Histórico de DAC	2,915	1,219-6,970	0,016

Para análise dos dados foi realizada a análise de regressão logística binária multivariada com o método *Backward*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. DAC, Doença Arterial Coronariana; IC 95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Em relação às variáveis laboratoriais, pôde-se observar que o modelo ajustado multivariado com menor número de variáveis explicativas apresentou uma influência das contagens de hemoglobina (Hb) e de plaquetas, das

dosagens de HDLc e ALT, e dos valores de ADPteste na categorização de resposta ao AAS.

Dentre essas variáveis, as que apresentaram risco na classificação dos pacientes como não respondedores foram as dosagens de Hb e os valores de ADPteste. Ao mesmo tempo, um aumento das dosagens de ALT e de HDLc, assim como da contagem de plaquetas, pareceu diminuir o risco de o paciente ser não respondedor. Embora não tenham apresentado um resultado estatisticamente significativo nesse modelo, as dosagens de VLDLc, de TG e de fibrinogênio mostraram uma tendência em influenciar na classificação de resposta ao AAS (**tabela 5**).

Tabela 5 Análise multivariada da influência das características laboratoriais na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS

Variáveis (n=117)	Odds Ratio	IC 95%	p
Hemoglobina	1,696	1,085-2,650	0,020
Plaquetas	0,990	0,979-1,000	0,049
HDLc	0,925	0,864-0,990	0,024
VLDLc	0,124	0,014-1,069	0,058
Fibrinogênio	1,009	1,000-1,018	0,051
Triglicérides	1,507	0,980-2,318	0,062
ADPteste	1,007	1,004-1,010	<0,001
ALT	0,938	0,894-0,984	0,009
PCRus	1,654	0,799-3,422	0,175

Para análise dos dados foi realizada a análise de regressão logística binária multivariada com o método *Backward*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ADPteste, Teste de agregação plaquetária que utiliza o ADP como agonista e avalia resposta ao clopidogrel; ALT, Alanina aminotransferase; IC 95%, Intervalo de Confiança de 95%; HDLc, Colesterol da lipoproteína de alta densidade; PCRus, Proteína C-reativa ultrassensível; VLDLc, Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Quando os fatores de risco e as características laboratoriais com resultados estatisticamente significativos ou tendência a influenciarem na resposta ao AAS foram analisados em conjunto em um novo modelo multivariado, verificou-se que todos exerciam influência sobre a classificação

de resposta ao AAS, exceto a contagem de plaquetas e as dosagens de PCRus.

Após o ajuste de modelo, o histórico de DAC mostrou aumentar em mais de 5 vezes o risco de o paciente em ser classificado como não respondedor a esse medicamento. As dosagens de Hb, fibrinogênio e TG também aumentaram o risco da categorização dos pacientes no T3 de resposta. Por outro lado, o aumento das dosagens de VLDLc, ALT e HDLc mostraram ter influência na diminuição do risco de os pacientes caírem no T3 de resposta ao AAS (tabela 6).

Tabela 6 Análise multivariada da influência dos fatores de risco e de características laboratoriais na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS

Variáveis (n=116)	Odds Ratio	IC 95%	p
Hemoglobina	1,832	1,167-2,878	0,009
Fibrinogênio	1,010	1,002-1,018	0,010
HDLc	0,920	0,857-0,988	0,021
ADPteste	1,007	1,004-1,010	<0,001
ALT	0,932	0,889-0,978	0,004
VLDLc	0,085	0,010-0,719	0,024
Triglicérides	1,627	1,062-2,492	0,025
Histórico de DAC	5,737	1,762-18,678	0,004

Para análise dos dados foi realizada a análise de regressão logística binária multivariada com o método *Backward*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ADPteste, Teste de agregação plaquetária que utiliza o ADP como agonista e avalia resposta ao clopidogrel; ALT, Alanina aminotransferase; DAC, Doença arterial coronariana; HDLc, Colesterol de lipoproteína de alta densidade; IC 95%, Intervalo de Confiança de 95%; VLDLc, Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Quando analisadas no modelo univariado, observou-se que os valores de ADPteste, as dosagens de fibrinogênio e a presença de histórico de DAC perderam um pouco de sua influência na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS, porém, influenciaram significativamente nos valores de ASPIteste. Os resultados indicaram que, somente após ajuste para outros

fatores, a contagem de Hb, as dosagens de VLDLc e de TG influenciaram na classificação de resposta, pois não apresentaram resultado significativo na análise univariada. Ao mesmo tempo, foi demonstrada uma tendência das dosagens de HDLc e de ALT em influenciarem a resposta ao AAS (tabela 7).

Tabela 7 Análise univariada da influência dos fatores de risco e das características clínicas na classificação dos pacientes como não respondedores ao AAS

Variáveis (n)	Odds Ratio	IC 95%	p
Hemoglobina (126)	1,196	0,901-1,588	0,216
Fibrinogênio (125)	1,007	1,002-1,013	0,008
HDLc (126)	0,959	0,920-1,000	0,053
ADPteste (126)	1,004	1,002-1,007	<0,001
VLDLc (122)	0,993	0,967-1,018	0,569
Triglicérides (126)	1,001	0,998-1,004	0,578
ALT (124)	0,976	0,949-1,004	0,087
Histórico de DAC (122)	2,664	1,191-5,963	0,017

Para análise dos dados foi realizada a análise de regressão logística binária univariada com o método *Enter*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ADPteste, Teste de agregação plaquetária que utiliza o ADP como agonista e avalia resposta ao clopidogrel; ALT, Alanina aminotransferase; DAC, Doença arterial coronariana; HDLc, Colesterol de lipoproteína de alta densidade; IC 95%, Intervalo de Confiança de 95%; VLDLc, Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

4.1.2 Dados biodemográficos e características clínico-laboratoriais dos pacientes em relação aos tercís de resposta ao clopidogrel

Como pode ser observado através da tabela 8, nenhuma variável categórica apresentou-se associada aos tercís de resposta ao clopidogrel. No entanto, pôde-se observar que houve associação de variáveis contínuas, como leucócitos, plaquetas, AST, glicose, ASPIteste e TRAPteste com as categorias de tercís de resposta ao clopidogrel.

Tabela 8 Características clínicas e laboratoriais e dados biodemográficos dos pacientes em relação aos tercís de resposta ao clopidogrel

	Total 100% (126)	Tercil de resposta ao clopidogrel			p
		T1 (n=42)	T2 (n=41)	T3 (n=43)	
Características Clínicas					
Idade, anos	60 (54-67)	61 (53-67)	59 (54-65)	60 (55-67)	0,626
IMC, Kg/m ²	26,8 (24,5-29,6)	26,0 (24,2-29,1)	27,3 (26,1-30,5)	27,0 (24,1-29,4)	0,251
Sexo masculino	77,8 (98)	33,7 (33)	33,7 (33)	32,7 (32)	0,831
feminino	22,2 (28)	32,1 (9)	28,6 (8)	39,3 (11)	
Fumantes ativos	21,4 (27)	29,6 (8)	25,9 (7)	44,4 (12)	0,481
Consumo de álcool	18,4 (23)	43,5 (10)	39,1 (9)	17,4 (4)	0,146
Prática de exercício	16,1 (20)	30,0 (6)	30,0 (6)	40,0 (8)	0,825
Diabéticos	36,8 (46)	28,3 (13)	32,6 (15)	39,1 (18)	0,620
Hipertensos	81,6 (102)	30,4 (31)	32,4 (33)	37,3 (38)	0,323
Dislipidêmicos	75,2 (94)	33,0 (31)	31,9 (30)	35,1 (33)	0,966
Histórico de DAC	45,6 (57)	33,3 (19)	36,8 (21)	29,8 (17)	0,669
HUDC (h)	16,0 (11-19)	16,0 (12,0-19,0)	16,0 (11,5-20,0)	14,0 (8,0-19,0)	0,333
HUDA (h)	18,0 (16-19,5)	18,0 (16,0-19,0)	18,5 (16,5-20,0)	18,0 (14,0-19,0)	0,287
Nº angioplastias anteriores					
0	11,9 (15)	40,0 (6)	26,7 (4)	33,3 (5)	0,918
1	63,5 (80)	31,2 (25)	32,5 (26)	36,2 (29)	
2 ou mais	24,6 (31)	35,5 (11)	35,5 (11)	29,0 (9)	
Diagnóstico[‡]					
Assintomático	37,6 (47)	34,0 (16)	36,2 (17)	29,8 (14)	0,538
Angina estável	58,5 (73)	32,9 (24)	31,5 (23)	35,6 (26)	
SCA sem supra	3,2 (4)	0 (0)	25,0 (1)	75,0 (3)	
SCA com supra	0,8 (1)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	
Uso de Medicamentos					
Beta-bloqueadores	85,5 (106)	32,1 (34)	35,8 (38)	32,1 (34)	0,204
Inibidores da ECA	56,5 (70)	35,7 (25)	28,6 (20)	35,7 (25)	0,460
Estatinas	94,4 (117)	30,8 (36)	34,2 (40)	35,0 (41)	0,302
Inibidores de prótons	16,1 (20)	30,0 (6)	40,0 (8)	30,0 (6)	0,825
Exames Laboratoriais					
Hb, g/dL	14,2(13,1-15,1)	14,1 (13,1-15,1)	14,3 (13,4-14,9)	13,9 (12,9-15,2)	0,954
Hematócrito	42,2(40,3-44,4)	42,5 (40,8-45,0)	41,9 (40,3-44,5)	41,8 (40,2-44,4)	0,785
Leucócitos, 10 ³ /uL	6700 (5670-7900)	5955 (5190-6900) ^a	6930 (5800-7570) ^{a, b}	7320 (6120-8620) ^b	0,002
Plaquetas, 10 ³ /uL	244 (197-290)	248 (191-303) ^{a, b}	221 (194-256) ^a	251 (221-298) ^b	0,047
PCRus, mg/L	0,4 (0,2-1,0)	0,2 (0,1-0,8)	0,5 (0,2-1,1)	0,5 (0,2-1,1)	0,099
Fibrinogênio, mg/dL	334(289,3-391,2)	334,0 (284,6-382,9)	316,7(277,1-383,4)	359,2 (294,0-398,0)	0,426
Glicose, mg/dL	101 (93-121)	97 (89-119)	108 (96-191)	100 (90-178)	0,049
Creatinina, mg/dL	0,9 (0,7-1,0)	0,8 (0,7-1,0)	0,9 (0,7-1,0)	0,9 (0,7-1,0)	0,850
AST, UL	24 (20-30)	26 (22-34) ^a	24 (20-30) ^{a, b}	21 (18-27) ^b	0,028
ALT, UL	36 (29-43)	37 (29-46)	36 (29-46)	33 (30-41)	0,502
Triglicérides, mg/dL	128 (96-188)	125 (91-160)	127 (94-188)	136 (98-205)	0,609
Colesterol total, mg/dL	167 (141-191)	172 (147-196)	155 (134-199)	157 (140-186)	0,273
HDLc, mg/dL	41 (35-47)	42 (35-49)	41 (35-47)	41 (36-45)	0,748
LDLc, mg/dL	91 (75-120)	101 (80-120)	82 (67-111)	88 (69-126)	0,093
VLDLc, mg/dL	25 (19-36)	24 (18-31)	25 (18-37)	27 (20-39)	0,538

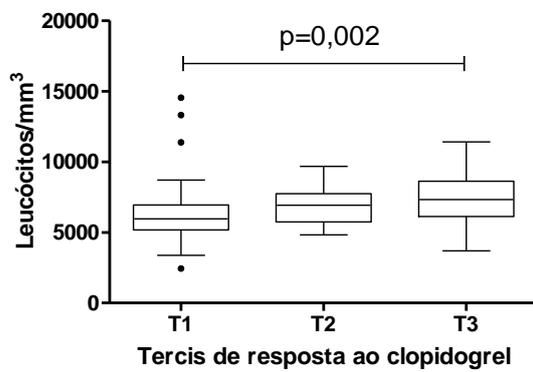
Ácido úrico,	5,2 (4,2-6,0)	4,9 (4,3-6,0)	5,1 (4,1-5,7)	5,5 (4,1-6,0)	0,865
ADPteste, UA*min	240 (150-400)	130 (90-150) ^a	240 (200-325) ^b	495 (425-620) ^c	<0,001
ASPIteste, UA*min	140 (80-270)	85 (50-160) ^a	240 (200-300) ^b	490 (390-580) ^c	<0,001
TRAPteste, UA*min	975 (790-1230)	820 (580-1000) ^a	900 (780-1120) ^{a,b}	1230 (1080-1420) ^c	<0,001

Os dados estão expressos em mediana (percentil 25%-percentil 75%) ou porcentagem (número de pacientes). A categorização dos pacientes foi realizada através da distribuição em tercios, de acordo com o valor de unidade de agregação plaquetária de ASPIteste e baseados do estudo de Luchessi e colaboradores (2012). O valor de p (P) foi determinado pelos testes Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ou ANOVA com pós-teste de Tukey para as variáveis contínuas e pelo teste exato de Fisher para as variáveis categóricas. ADPteste: teste de agregação plaquetária que emprega o difosfato de adenosina (ADP) como agonista para avaliar resposta ao clopidogrel; ALT, Alanina Transaminase; ASPIteste: teste de agregação plaquetária que emprega o ácido araquidônico como agonista para avaliar resposta ao AAS; AST, Aspartato Transaminase; DAC, Doença Arterial Coronariana; Hb, Hemoglobina; HDLc, colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade; HUDA, Horário da Última Dose de AAS; HUDC, Horário da Última Dose de Clopidogrel; IMC, Índice de Massa Corpórea; LDLc, colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade; PCRus, Proteína C Reativa ultrasensível; SCA com supra, Síndrome Coronariana Aguda com supradesnivelamento do segmento ST; SCA sem supra, Síndrome Coronariana Aguda sem supradesnivelamento do segmento ST; TRAPteste, teste de agregação plaquetária que emprega o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) como agonista para verificar resposta na via da trombina; UA*min, Unidades de agregação por minuto; VLDLc, colesterol da Lipoproteína de Muito Baixa Densidade. ^a, ^b, ^cLetras diferentes na mesma linha correspondem a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. [†]Diagnóstico do paciente no momento em que foi encaminhado para o procedimento de angioplastia.

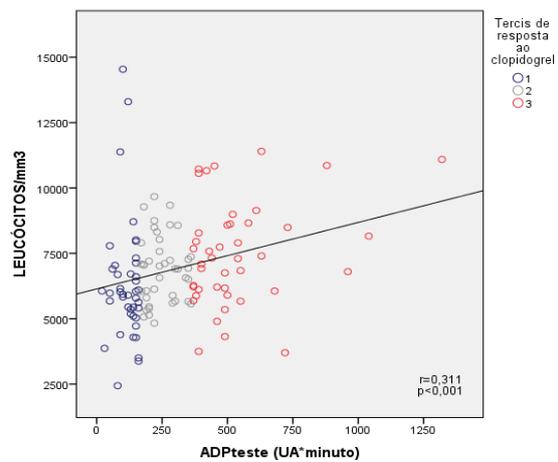
As variáveis com associação estatisticamente significativa entre os tercios de resposta ao clopidogrel foram avaliadas em relação à correlação com os valores de ADPteste, e observou-se uma baixa correlação, porém significativa, entre os valores de leucócitos e AST com a não resposta ($r=0,311$, $p < 0,001$ e $r=-0,255$, $p=0,004$, respectivamente) (**tabela 8**). Ao mesmo tempo, pôde-se observar uma associação com correlação moderada dos valores de ASPIteste e de TRAPteste ($r=0,505$, $p < 0,001$ e $r=0,569$, $p < 0,001$) com a classificação dos pacientes como não respondedores. Na figura 12, são demonstradas as correlações das dosagens de leucócitos e AST, assim como dos valores de TRAPteste, com os valores de ADPteste (**figura 15B, D e F**).

Embora tenha sido encontrada associação entre a contagem de plaquetas e o T2 e T3 de resposta ao clopidogrel (**figura 15G**), não houve correlação com os valores de ADPteste, o que foi observado também com as dosagens de glicose ($r=0,107$, $p=0,235$ e $r=0,159$, $p=0,076$, respectivamente) (**tabela 9**).

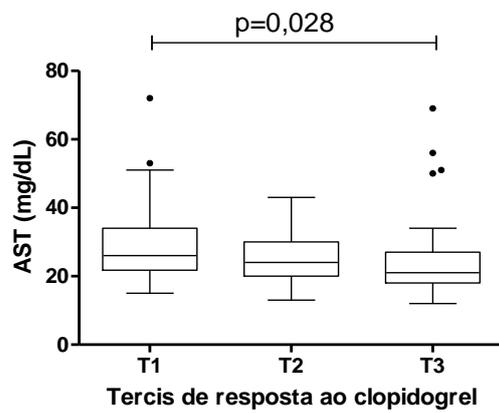
A



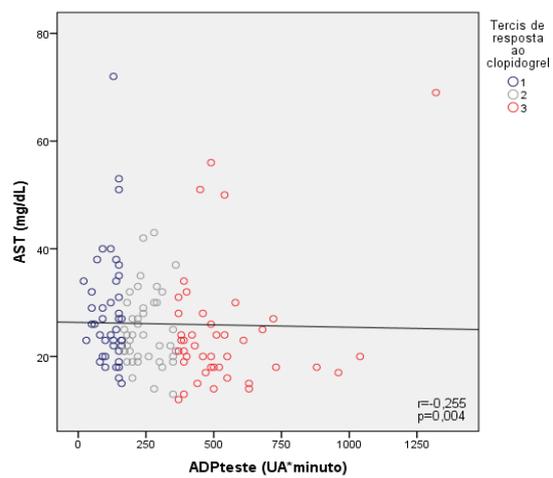
B



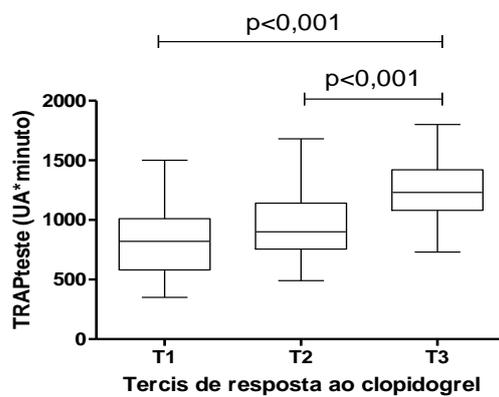
C



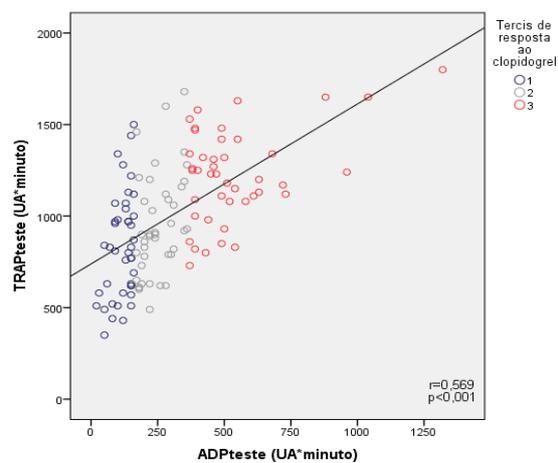
D



E



F



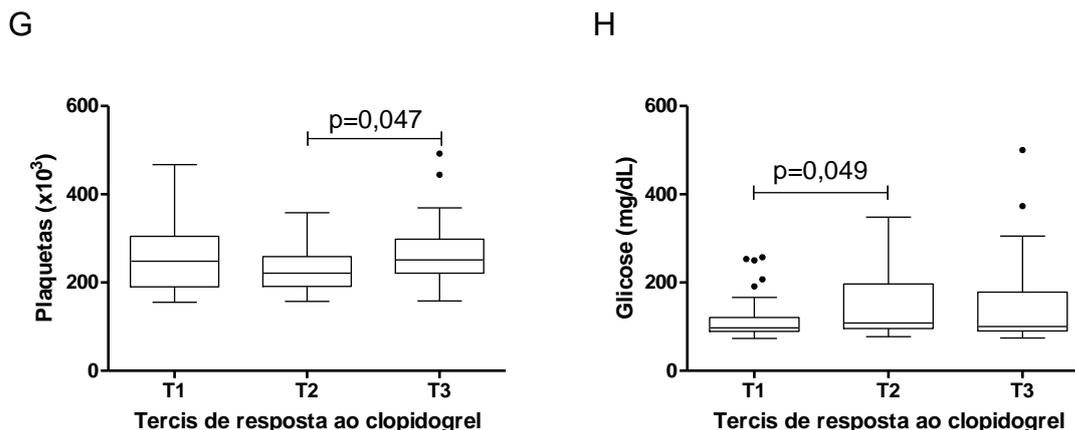


Figura 15. Gráfico em caixas com barras de erro (Tukey) e diagramas de dispersão representando variáveis laboratoriais com diferenças estatisticamente significativas encontradas entre os valores de ADPteste. A, Associação dos valores de leucócitos com os tercis de resposta ao clopidogrel; B, Diagrama de dispersão correlacionando as dosagens de leucócitos e os valores de ADPteste; C, Associação das dosagens de AST com os tercis de resposta ao clopidogrel; D, Diagrama de dispersão correlacionando a dosagem de AST com os valores de ADPteste; E, Associação dos valores de TRAPteste com os tercis de resposta ao clopidogrel; F, Diagrama de dispersão correlacionando os valores de agregação do TRAPteste com os valores de ADPteste; G, Associação dos valores da dosagem de plaquetas com os tercis de resposta ao clopidogrel; H, Associação das dosagens de glicose com os tercis de resposta ao clopidogrel. A análise estatística de associação foi realizada através do teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn e a análise de correlação foi feita através do teste de Spearman. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ADPteste, Teste de agregação plaquetária que emprega o difosfato de adenosina (ADP) como agonista e avalia resposta ao clopidogrel; AST, Aspartato amino-transferase; TRAPteste, Teste de agregação plaquetária que utiliza o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) como agonista da reação e avalia vias de coagulação da trombina. Os pontos representam *outliers*.

Tabela 9 Correlação das variáveis laboratoriais com os valores de ADPteste

Variáveis (n=126)	Coefficiente de correlação (r)	p
Leucócitos	0,311	<0,001
AST	-0,255	0,004
ASPIteste	0,505	<0,001
TRAPteste	0,569	<0,001
Plaquetas	0,107	0,235
Glicose	0,159	0,076

Para a análise dos dados foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ASPIteste: teste de agregação plaquetária que emprega o ácido araquidônico com agonista para avaliar resposta ao AAS; AST, Aspartato aminotransferase; TRAPteste, Teste de agregação plaquetária que utiliza o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) como agonista da reação e avalia vias de coagulação da trombina.

Para avaliar se houve alguma influência das variáveis clínicas e laboratoriais, dos fatores de risco e dos medicamentos concomitantemente administrados (covariantes) na categorização dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel (variável dependente), ou seja, na obtenção de

ADPteste > 370UA*minuto, utilizou-se regressão logística binária, com análise de ajuste de modelo através do teste de Hosmer e Lemeshow. O modelo de análise da influência das variáveis na classificação de resposta ao clopidogrel seguiu o modelo empregado para a classificação de resposta ao AAS, dando ênfase, primeiramente, à análise multivariada.

Dentre os medicamentos concomitantemente administrados, verificou-se que nenhum deles apresentou influência na categorização dos pacientes como não respondedores (**tabela 10**).

Tabela 10 Análise multivariada da influência dos medicamentos concomitantemente administrados na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel

Variáveis (n=124)	Odds ratio	IC 95%	p
Beta-bloqueadores	2,366	0,827-6,764	0,108
Inibidores da ECA	0,775	0,355-1,691	0,522
Estatinas	0,597	0,104-3,437	0,563
Inibidores da bomba de prótons	1,375	0,479-3,945	0,554

Para a análise foi realizada regressão logística binária multivariada com o método *Backward*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ECA, Enzima conversora de angiotensina.

Em relação aos fatores de risco, observou-se que, através de um ajuste de modelo para outros fatores de risco, o consumo de álcool mostrou ter influência na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel, aumentando em quase 6X a chance de o paciente apresentar valores de agregação de ADPteste \geq 370UA*minuto (**tabela 11**).

Tabela 11 Análise multivariada da influência dos fatores de risco na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel

Variáveis (n=118)	Odds Ratio	IC 95%	p
Sexo	0,783	0,289-2,121	0,631
Obesidade	1,342	0,505-3,564	0,555
Fumo	0,483	0,171-1,366	0,127
Consumo de álcool	5,839	1,350-25,258	0,018
Inatividade física	0,454	0,146-1,409	0,172
Diabetes	0,681	0,286-1,625	0,387
Hipertensão	0,474	0,142-1,585	0,226
Dislipidemia	0,860	0,289-2,555	0,786
Histórico de DAC	1,523	0,660-3,519	0,324

Para análise dos dados foi realizada regressão logística binária multivariada com o método *Backward*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. DAC, Doença Arterial Coronariana; IC 95%, Intervalo de Confiança de 95%.

Em relação aos exames laboratoriais, após ajuste para outros fatores, observou-se influência de ASPIteste, de TRAPteste, das dosagens de VLDLc e de triglicérides na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel (**tabela 12**).

Tabela 12 Análise multivariada da influência das características laboratoriais na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel

Variáveis (n=113)	Odds ratio	IC 95%	P
ASPIteste	1,008	1,003-1,012	<0,001
TRAPteste	1,004	1,002-1,006	<0,001
VLDLc	8,880	1,285-61,364	0,027
Triglicérides	0,647	0,440-0,953	0,027

Para a análise foi realizada regressão logística binária multivariada com o método *Backward*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ASPIteste, teste de agregação plaquetária que utiliza o ácido araquidônico como agonista para verificar resposta ao AAS; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; TRAPteste, teste de agregação plaquetária que utiliza o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) para avaliar resposta à via da trombina; VLDL, Lipoproteína de muito baixa densidade.

Quando os fatores de risco e as características laboratoriais com resultados estatisticamente significativos foram analisados em conjunto em um novo modelo multivariado, verificou-se que somente o consumo de álcool não apresentou influência na classificação de resposta ao clopidogrel. O aumento

das dosagens de VLDLc, dos valores de ASPIteste e de TRAPteste aumentaram a chance dos pacientes em apresentarem valores de ADPteste \geq 370UA*minuto, enquanto o aumento das dosagens de triglicérides pareceu diminuir esse risco (**tabela 13**).

Tabela 13 Análise multivariada da influência dos fatores de risco e das características laboratoriais na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel

Variáveis (n=121)	Odds ratio	IC 95%	P
ASPIteste	1,005	1,002-1,008	0,001
TRAPteste	1,004	1,002-1,006	<0,001
VLDLc	12,060	1,784-81,512	0,011
Triglicérides	0,608	0,415-0,890	0,011
Consumo de álcool	1,716	0,386-7,632	0,478

Para a análise foi realizado o teste de regressão logística binária multivariada com o método *Backward*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ASPIteste, teste de agregação plaquetária que utiliza o ácido araquidônico como agonista para verificar resposta ao AAS; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; TRAPteste, teste de agregação plaquetária que utiliza o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) para avaliar resposta à via da trombina; VLDLc, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Quando analisadas por regressão logística univariada, com o intuito de verificar a influência isolada de cada uma das variáveis anteriormente citadas como significativas na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel, verificamos que somente os valores de agregação de ASPIteste e TRAPteste demonstraram aumento de chances de os pacientes apresentarem valores de ADPteste no T3 de resposta ao clopidogrel (**tabela 14**). Verificou-se que, somente após ajuste do modelo para outras variáveis, as dosagens de VLDLc e de TG mostraram influência sobre a categorização dos pacientes no T3 de resposta ao clopidogrel, como podemos observar comparando-se as tabelas 13 e 14.

Tabela 14 Análise univariada da influência das características clínicas e dos fatores de risco na classificação dos pacientes como não respondedores ao clopidogrel

Variáveis (n)	Odds ratio	IC 95%	p
ASPIteste (126)	1,005	1,003-1,007	<0,001
TRAPteste (126)	1,004	1,003-1,006	<0,001
VLDL (122)	1,012	0,988-1,037	0,332
Triglicérides (126)	1,001	0,998-1,004	0,522
Consumo de álcool (125)	2,940	0,931-9,285	0,066

Para a análise foi realizada regressão logística binária univariada com o método *Enter*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ASPIteste, teste de agregação plaquetária que utiliza o ácido araquidônico como agonista para verificar resposta ao AAS; IC 95%, intervalo de confiança de 95%; TRAPteste, teste de agregação plaquetária que utiliza o peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) para avaliar resposta à via da trombina; VLDL, colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade.

4.2 Sequenciamento dos miRNAs

A partir da observação de que valores de ASPIteste influíram nos valores de ADPteste e vice-versa, foram sequenciadas 6 amostras concomitantemente classificadas como não-respondedoras ao AAS e ao clopidogrel (categorizadas no T3 de AAS + T3 de clopidogrel) e 6 amostras concomitantemente classificadas como respondedoras ao AAS e ao clopidogrel (categorizadas no T1 de AAS + T1 de clopidogrel). Todas elas apresentavam um RIN \geq 8,0. O sequenciamento demonstrou boas métricas de qualidade. A percentagem Q30, que mede a acurácia de 1 adição de base a cada 1000 adicionadas, ficou acima de 85%, com uma densidade média de agrupamentos de sequências em torno de 1000K/mm² (figura 16).

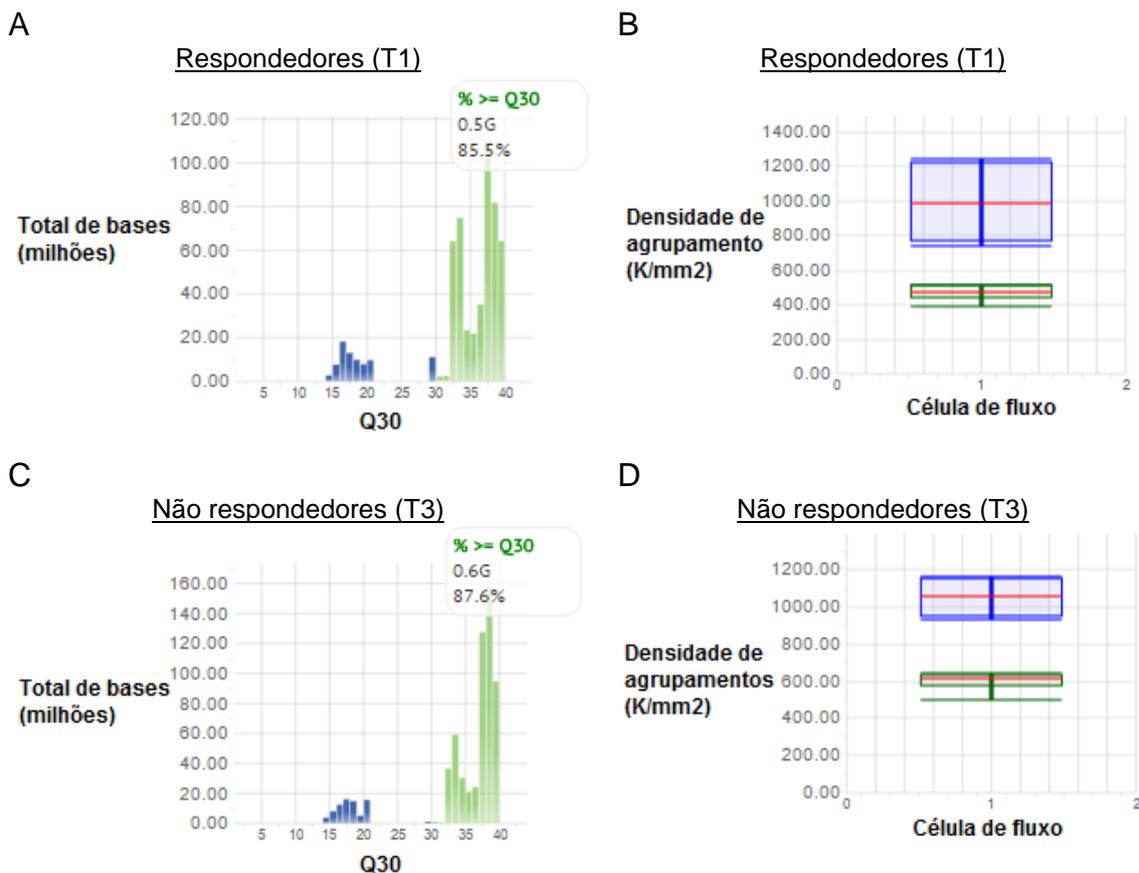


Figura 16. Porcentagem de Q30 e densidade dos agrupamentos (*clusters*) em cada sequenciamento. A, Porcentagem de Q30 no sequenciamento das amostras de pacientes que foram classificados como respondedores tanto para o AAS quanto para o clopidogrel (T1); B, Densidade de agrupamento das sequências do grupo de pacientes classificados como respondedores tanto para o AAS quanto para o clopidogrel; C, Porcentagem de Q30 no sequenciamento das amostras de pacientes que foram classificados como não respondedores tanto ao AAS quanto ao clopidogrel (T3); D, Densidade de agrupamento das sequências do grupo de pacientes classificados como não respondedores tanto ao AAS quanto ao clopidogrel. T1, tercil 1 de resposta; T3, tercil 3 de resposta.

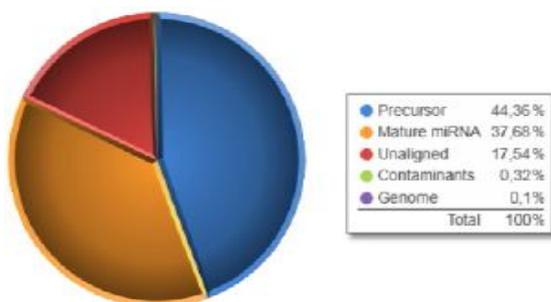
O total de leituras (*reads*) de cada amostra, o comprimento médio das sequências e a quantidade de miRNAs anotados no *miRBase* foram identificados nas tabelas 15 e nas figuras 17 e 18. No momento da análise, o banco de dados do *miRBase* possuía 1872 sequências anotadas para *Homo sapiens*.

Tabela 15. Dados do sequenciamento das amostras de T1 e T3 de acordo com a análise do software *CLC Genomics*

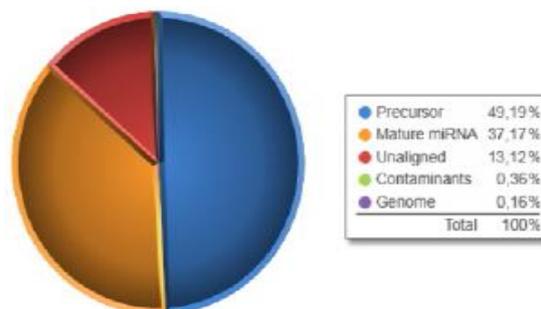
Amostras	Total de reads	Reads pós-corte	Reads anotadas	Reads não-anotadas	CM* das sequências	miRNAs	% miRBase
T1							
1	2015846	1665063	1647326	17737	21,8	221	11,8
2	1539635	1342134	1324582	17552	21,9	275	14,7
3	959246	827903	815861	12042	22,0	213	11,4
4	1788487	1536066	1517444	18622	21,9	279	14,9
5	1102403	841261	825537	15724	22,0	264	14,1
6	2009344	1779894	1758003	21891	22,0	270	14,4
T3							
7	2264360	1917345	1876093	41252	22,3	281	15,0
8	2002238	1682115	1643768	38347	22,4	249	13,3
9	1599251	1336403	1308538	27865	22,4	230	12,3
10	2258273	1917773	1880458	37315	22,5	222	11,9
11	1136560	959438	936773	22665	22,6	181	9,67
12	2111551	1797520	1762815	34705	22,5	215	11,5

CM, Comprimento Médio. T1, Tercil 1; T3, Tercil 3.

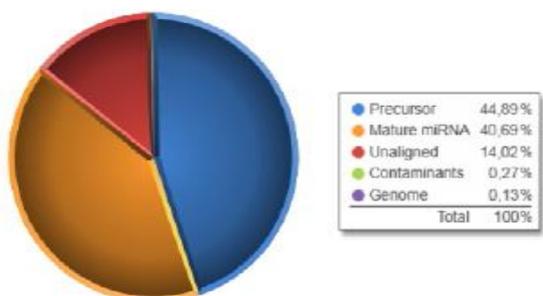
A



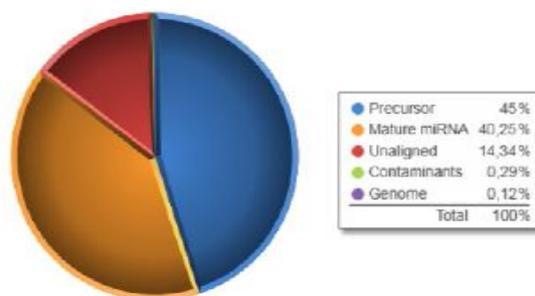
B



C



D



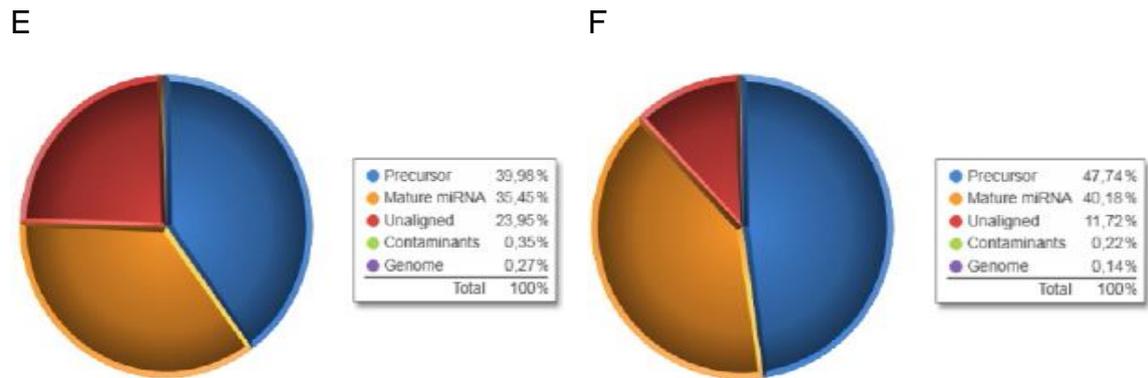
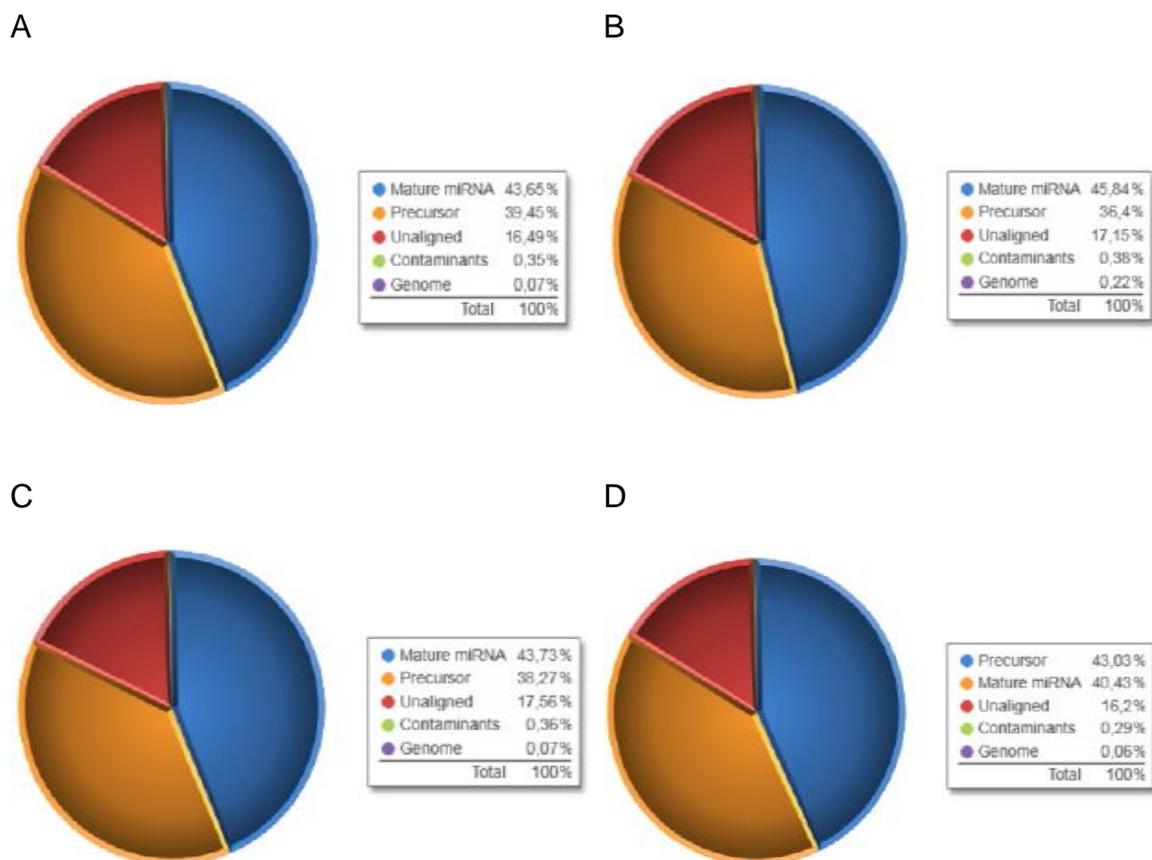


Figura 17. A, B, C, D, E, F, Porcentagem de *reads* alinhadas a miRNAs e a outras seqüências nas amostras de T1, de acordo com o *Miseq Reporter*. *Contaminants*, Contaminantes; *Genome*, Genoma; *Mature miRNA*, MiRNAs Maduros; *Precursor*, MiRNA Precursor; *Unaligned*, Seqüências não Alinhadas.



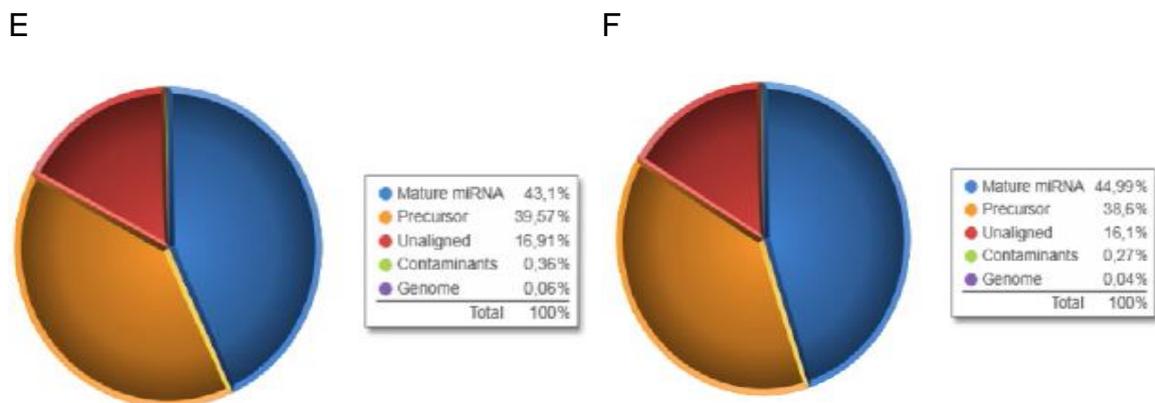


Figura 18. A, B, C, D, E, F, Porcentagem de *reads* alinhadas a miRNAs e a outras seqüências nas amostras de T3, de acordo com o *Miseq Reporter*. *Contaminants*, Contaminantes; *Genome*, Genoma; *Mature miRNA*, MI RNAs Maduros; *Precursor*, MiRNA Precursor; *Unaligned*, Sequências não Alinhadas.

Somente foram comparadas as expressões de miRNAs encontrados em todas as amostras. Ao todo, 526 miRNAs foram sequenciados e identificados no banco de dados do *miRBase*. Cento e dez foram encontrados em todas as amostras e 18 encontraram-se diferentemente expressos de acordo com a análise realizada pelo *Deseq2* (tabela 16, figuras 19 e 20).

Foram considerados diferentemente expressos miRNAs com diferença de expressão maior ou igual a 1,5 vezes (*fold change*). Dentre esses miRNAs diferentemente expressos, o hsa-miR-183-5p foi o miRNA com maior diferença entre os mais expressos e o hsa-miR-423-3p foi o miRNA com maior diferença entre os menos expressos no grupo T3.

Tabela 16. Resultados ilustrando os miRNAs diferentemente expressos no grupo de não respondedores (T3)

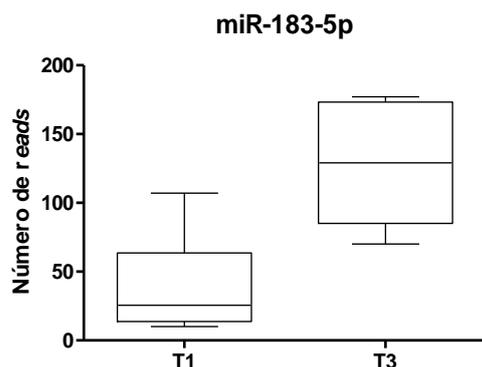
miRNA	Sequência	Fold change**	p ajustado
hsa-miR-183-5p*	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	4,44	1,5572E-07
hsa-miR-423-3p*	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	-3,58	4,4739E-06
hsa-miR-186-5p*	CAAAGAAUUCUCCUUUUUGGCU	2,91	1,5489E-05
hsa-miR-191-5p*	CACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	3,16	4,6368E-05
hsa-miR-10a-5p*	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	2,97	6,3688E-05
hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	2,10	0,00017847
hsa-miR-144-5p	GAUAUCAUCAUAUCUGUAAG	-3,30	0,00017847
hsa-miR-7706	UGAAGCGCCUGUGCUCUGCCGAGA	2,89	0,00055221
hsa-miR-151a-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	2,34	0,00059796
hsa-miR-744-5p*	UGC GG GCUAGGGCUAACAGCA	-2,52	0,00425005
hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	2,08	0,00703184
hsa-miR-486-5p*	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	1,95	0,00946974
hsa-miR-146a-5p*	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	2,39	0,01137152
hsa-miR-501-3p	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUCU	2,23	0,01137152
hsa-miR-30a-5p*	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG	-2,49	0,01923621
hsa-let-7g-5p*	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	-1,97	0,0279021
hsa-miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUCUUCUGG	-1,89	0,03557714
hsa-miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	1,94	0,03913406

A análise de miRNAs diferentemente expressos foi realizada pelo pacote Deseq no programa R. Foram considerados diferentemente expressos os miRNAs com uma diferença de expressão $\geq 1,5$ no grupo T3 em relação ao grupo T1. Em vermelho está representada a região *seed* de cada sequência de miRNA. hsa, *Homo sapiens*; p ajustado, valor de p após ajuste para múltiplas comparações.

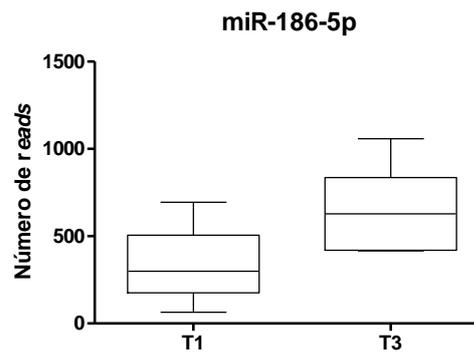
*miRNAs escolhidos para serem validados por qPCR;

**Quantas vezes o miRNA foi mais ou menos expresso em T3 em relação a T1.

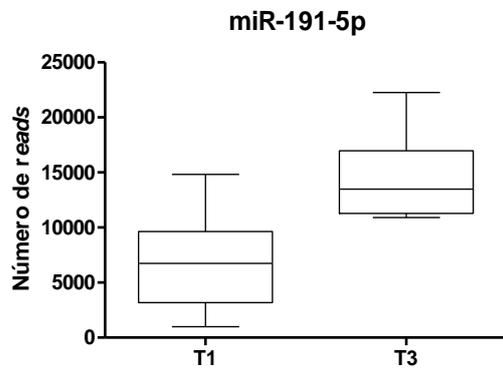
A



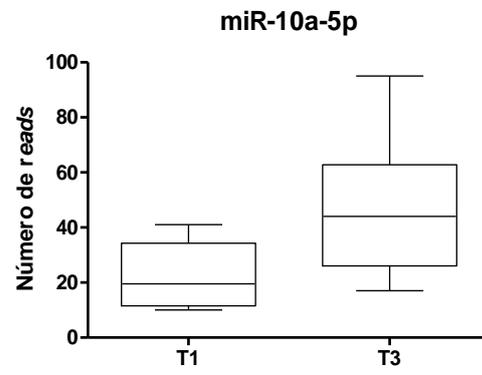
B



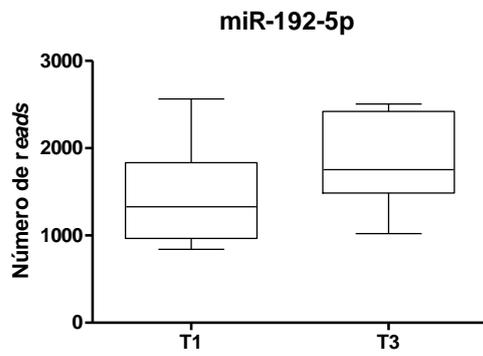
C



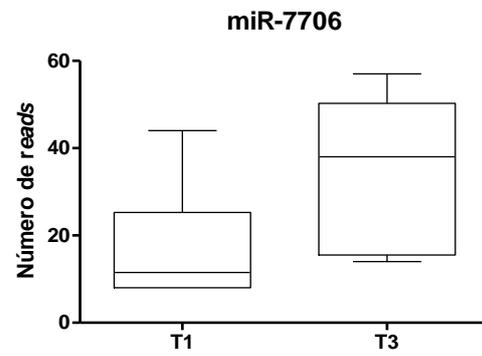
D



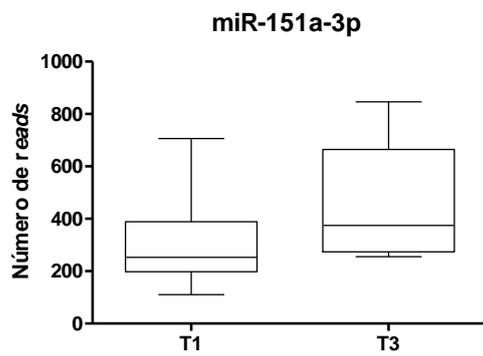
E



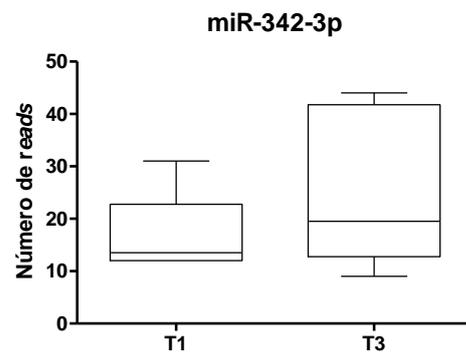
F



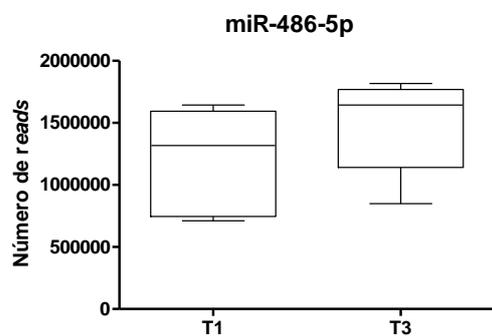
G



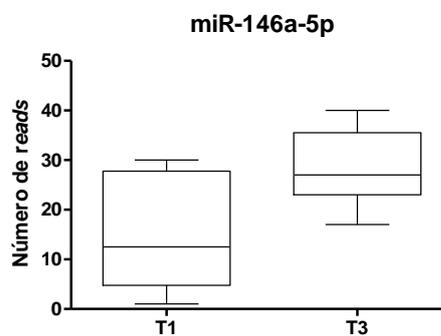
H



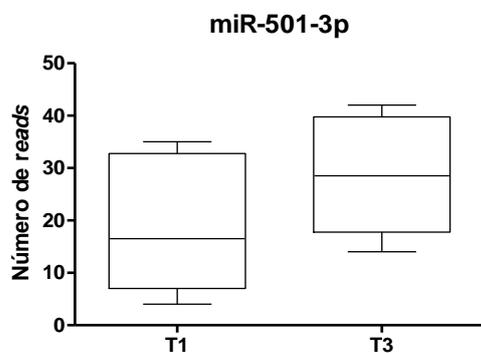
I



J



K



L

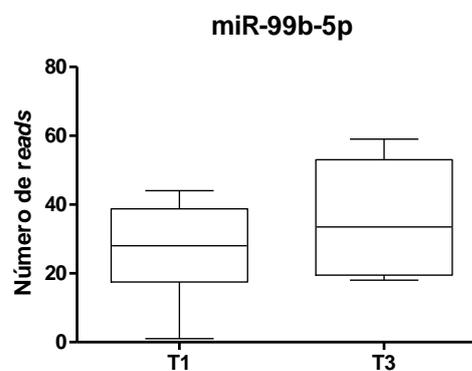
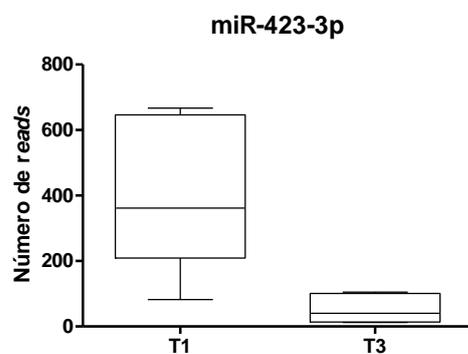
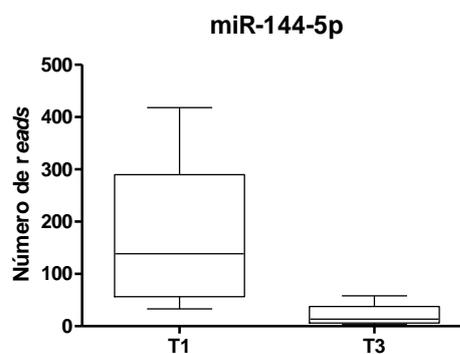


Figura 19. Gráficos de caixa com barras de erro no modelo Tukey representando a distribuição do número de *reads* dos miRNAs mais expressos estatisticamente significativos no tercil de pacientes não respondedores (T3) ao AAS e ao clopidogrel (A-L). T1, Tercil 1 de resposta ao AAS e ao clopidogrel; T3, Tercil 3 de resposta ao AAS e ao clopidogrel.

A



B



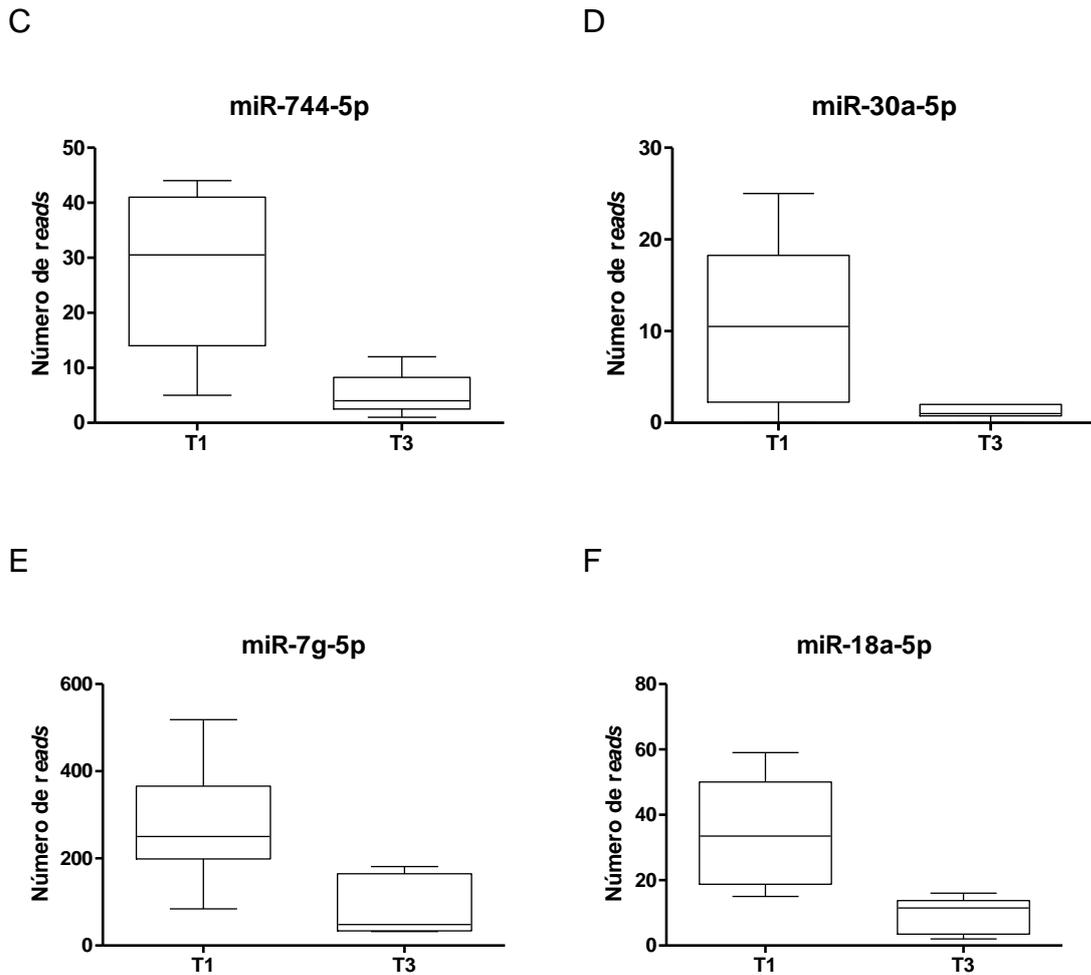
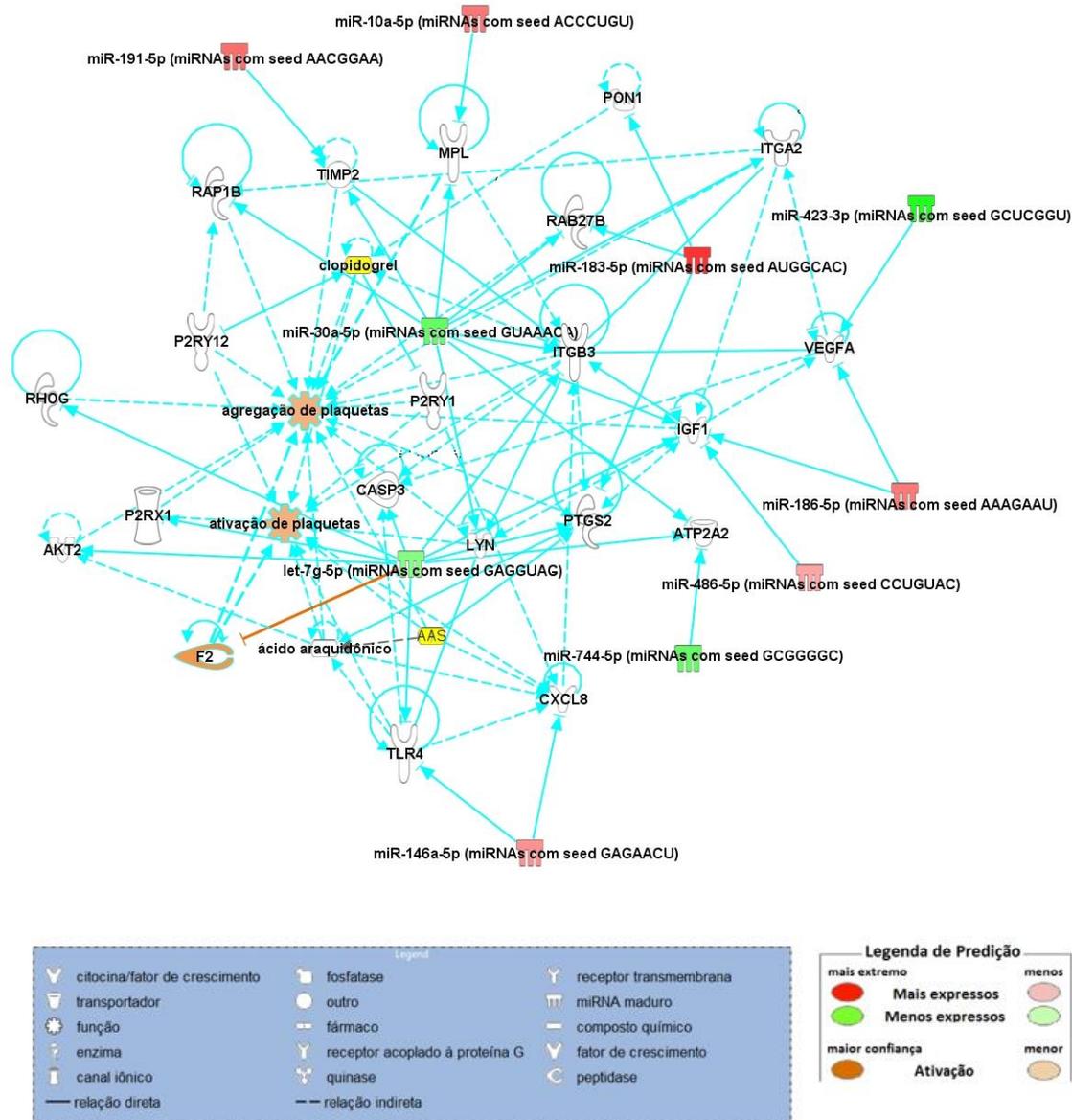


Figura 20. Gráficos de caixa com barras de erro no modelo Tukey representando a distribuição do número de *reads* dos miRNAs menos expressos estatisticamente significativos no tercil de pacientes não respondedores (T3) ao AAS e ao clopidogrel (A-F). T1, Tercil 1 de resposta ao AAS e ao clopidogrel; T3, Tercil 3 de resposta ao AAS e ao clopidogrel.

Os dezoito miRNAs diferentemente expressos foram selecionados e submetidos à análise dos alvos no *software Ingenuity®*. Após filtragem dos dados para doenças cardiovasculares e inflamatórias, alvos altamente preditos e validados, e vias relacionadas a plaquetas, observou-se que, dos dezoito miRNAs diferentemente expressos, dez deles continuavam na análise, os quais foram escolhidos para serem confirmados pela qPCR pois, quando diferentemente expressos em conjunto, mostraram levar a um aumento da

agregação e da ativação plaquetárias, com aumento também da trombina, a qual pode contribuir na ativação dessas vias (**figura 21**).



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 21. Diagrama de análise bioinformática no *software Ingenuity®*, mostrando os alvos de miRNAs diferentemente expressos os quais, quando desregulados em conjunto, estão relacionados com aumento da ativação e agregação plaquetárias e com a metabolização de antiagregantes. AAS, ácido acetilssalicílico; AKT2, Oncogene viral do timoma murino v-akt homólogo 2; ATP2A2, ATPase transportadora de cálcio do músculo cardíaco de contração lenta 2; CXCL8, Interleucina-8; F2, Fator II de coagulação (trombina); IGF1, Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (Somatomedina C); ITGA2, Integrina α -2; ITGB3, Integrina β -3; LYN, LYN proto-oncogene da família Src de tirosina quinase; MPL, MPL proto-oncogene receptor de trombopoietina; PON1, Paraoxonase 1; PTGS2, Prostaglandina-Endoperóxido Sintase 2; P2RY1, Receptor Purinérgico P2Y-1 acoplado à proteína G; P2RY12, Receptor Purinérgico P2Y-12 acoplado à proteína G; P2RX4, Receptor purinérgico P2X, canal iônico 4; RAB27B, Membro RAS da família oncogênica; RAP1B, Membro RAS da família oncogênica; RHOG, Membro G da família de homólogos ras; TIMP2, Inibidor 2 da metalopeptidase TIMP; VEGFA, Fator de crescimento A do endotélio vascular. Em amarelo estão destacados os dois antiagregantes plaquetários AAS e clopidogrel.

Dentre os alvos, encontraram-se moléculas relacionadas com a agregação plaquetária, atividade plaquetária, metabolismo de antiagregantes e aterosclerose, como a IL-8 (interleucina-8), ITGB3 (Integrina Beta 3), PON-1 (Paraoxonase 1) e Fator II de coagulação (trombina). A essas vias foram adicionados os dois medicamentos em estudo, assim como seus alvos terapêuticos, os quais apresentaram interligações (**figura 18**).

4.3 Confirmação dos resultados de sequenciamento pela qPCR

Após análise do sequenciamento, os 10 miRNAs diferentemente expressos envolvidos em vias de agregação e ativação plaquetárias foram escolhidos para serem confirmados pela qPCR *array* (sinalizados na **tabela 16**). Ao todo, foram analisadas 126 amostras pela qPCR, as quais pertenciam ou ao T1, ou ao T2 ou ao T3 de resposta ao AAS e/ou clopidogrel. Apenas 2 amostras foram retiradas da análise por apresentarem interferentes na qPCR e 2 amostras foram retiradas por haver perda de material.

Os resultados foram avaliados de acordo com a fórmula $2^{\Delta Ct}$, onde os valores de expressão dos miRNAs foram normalizados pela média geométrica dos valores de ciclo de *threshold* (Ct) de quatro normalizadores: snord61, snord68, snord95 e RNU6-6P. Para saber se os miRNAs estavam mais ou menos expressos no grupo de não respondedores em relação ao grupo de respondedores, utilizou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3.1 Confirmação dos resultados do sequenciamento pela qPCR nas amostras sequenciadas

A primeira etapa de confirmação foi verificar se houve semelhança dos resultados da qPCR com as 12 amostras sequenciadas. Uma delas foi excluída das análises, pois não apresentou resultados de acordo com o controle de qualidade da qPCR. Dentre os 10 miRNAs escolhidos para serem confirmados, 5 deles (hsa-miR-423-3p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p) apresentaram regulação da expressão em acordo com o sequenciamento e, portanto, foram confirmados. Dois dos cinco miRNAs confirmados mostraram-se diferentemente expressos: hsa-miR-744-5p ($p=0,004$, *fold change*=-2,56) e hsa-let-7g-5p ($p=0,017$, *fold change*=-4,01).

Já os miRNAs hsa-miR-183-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-146a-5p e hsa-miR-486-5p não obtiveram a mesma regulação de expressão encontrada no sequenciamento, sendo que dois deles (hsa-miR-191-5p e hsa-miR-486-5p) apresentaram-se diferentemente expressos ($p=0,018$, *fold change*=-1,91 e $p=0,017$, *fold change*=-1,36) (**tabela 17, figura 22**).

Tabela 17. Resultados da comparação da expressão pela qPCR dos miRNAs entre o grupo de não respondedores e respondedores nas amostras sequenciadas

miRNAs	$2^{\Delta Ct}$ (T1) n=5	$2^{\Delta Ct}$ (T3) n=6	p
hsa-miR-183-5p	0,045 (0,034-0,093)	0,025 (0,014-0,033)	0,052
hsa-miR-423-3p [†]	0,915 (0,811-1,039)	0,635 (0,438-0,896)	0,126
hsa-miR-186-5p [†]	0,346 (0,333-0,408)	0,523 (0,448-0,588)	0,052
hsa-miR-191-5p	29,074 (25,722-35,088)	15,211 (13,774-16,536)	0,009
hsa-miR-10a-5p	0,002 (0,001-0,003)	0,001 (0,001-0,002)	0,429
hsa-miR-744-5p [†]	0,131 (0,120-0,342)	0,051 (0,048-0,069)	0,004
hsa-miR-486-5p	152,208 (149,880-277,690)	111,890 (93,394-123,003)	0,017
hsa-miR-146a-5p	0,044 (0,039-0,050)	0,027 (0,024-0,035)	0,082
hsa-miR-30a-5p [†]	0,845 (0,770-1,312)	0,823 (0,602-0,904)	0,537
hsa-let-7g-5p [†]	1,256 (1,148-1,462)	0,313 (0,275-0,581)	0,017

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney e foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. † miRNAs com o mesmo perfil de expressão do sequenciamento.

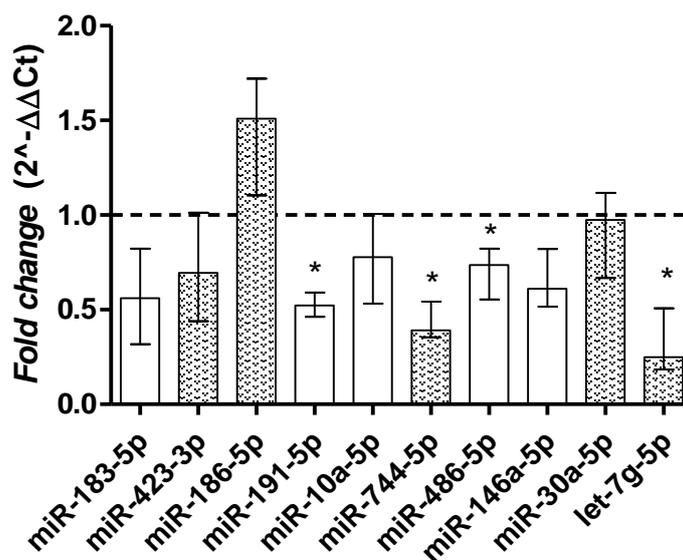


Figura 22. Gráfico de barras dos resultados de expressão relativa representando os miRNAs mais ou menos expressos nos pacientes não respondedores ao AAS e ao clopidogrel. As barras demonstram os valores de mediana e de intervalo interquartil dos resultados de expressão ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. Assinaladas com asterisco estão as barras que representam miRNAs com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$). As barras com pontos representam os miRNAs que tiveram perfis de expressão semelhantes ao do sequenciamento.

A partir do teste de Spearman, foi possível observar as correlações encontradas entre os resultados de sequenciamento e de qPCR para os miRNAs com perfis semelhantes de expressão (observados pela correlação

positiva), onde hsa-miR-744-5p e hsa-let-7g-5p mostraram correlações estatisticamente significativas entre os dois métodos (**figura 23**).

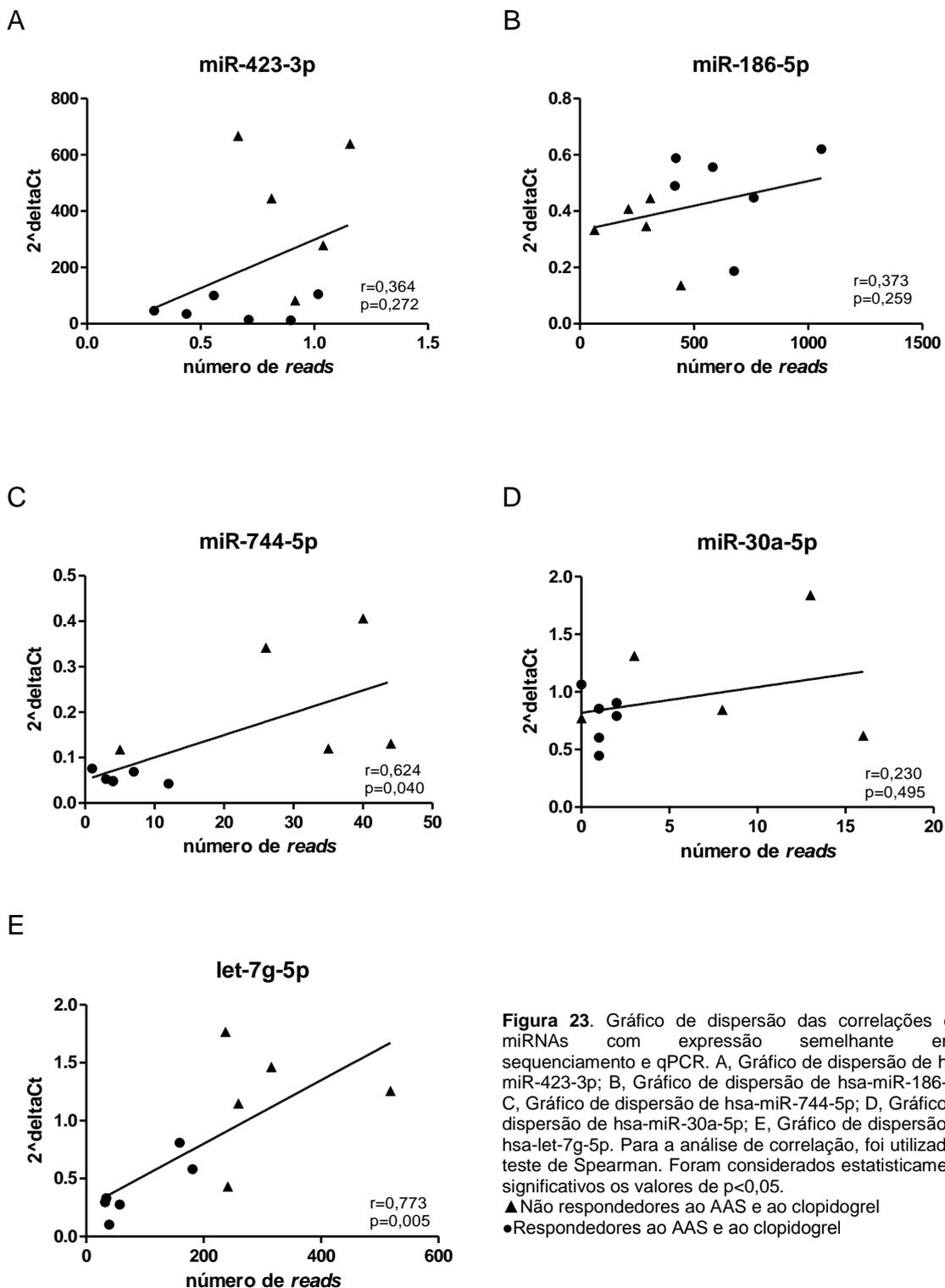


Figura 23. Gráfico de dispersão das correlações dos miRNAs com expressão semelhante entre sequenciamento e qPCR. A, Gráfico de dispersão de hsa-miR-423-3p; B, Gráfico de dispersão de hsa-miR-186-5p; C, Gráfico de dispersão de hsa-miR-744-5p; D, Gráfico de dispersão de hsa-miR-30a-5p; E, Gráfico de dispersão de hsa-let-7g-5p. Para a análise de correlação, foi utilizado o teste de Spearman. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

▲ Não respondedores ao AAS e ao clopidogrel
● Respondedores ao AAS e ao clopidogrel

4.3.2 Confirmação dos resultados de sequenciamento pela qPCR nas replicatas biológicas

Sendo assim, seguiu-se para a análise de expressão dos 10 miRNAs nas replicatas biológicas de respondedores (n=16) e não respondedores (n=19) a ambos os antiagregantes plaquetários, amostras as quais são representativas do T1 e do T3, respectivamente, apresentando as mesmas características de agregação que as amostras escolhidas para serem sequenciadas. Foram retiradas da análise duas amostras consideradas *outliers*.

Foi observado que as replicatas biológicas apresentavam o mesmo perfil de regulação que as amostras sequenciadas, exceto para o hsa-miR-186-5p, o qual se apresentou menos expresso nas replicatas e mais expresso nas amostras sequenciadas analisadas pela qPCR (**tabela 18, figura 24**).

Tabela 18. Resultados da comparação da expressão dos miRNAs entre o grupo de não respondedores e respondedores nas replicatas biológicas

miRNAs	$2^{\Delta Ct}$ (T1) n=16	$2^{\Delta Ct}$ (T3) n=19	p
hsa-miR-183-5p	0,020 (0,014-0,041)	0,016 (0,011-0,028)	0,230
hsa-miR-423-3p*	0,943 (0,685-1,108)	0,705 (0,482-0,999)	0,095
hsa-miR-186-5p	0,673 (0,268-0,847)	0,345 (0,223-0,518)	0,117
hsa-miR-191-5p	24,183 (17,553-30,651)	18,275 (11,030-22,825)	0,041
hsa-miR-10a-5p	0,001 (0,001-0,002)	0,001 (0,001-0,002)	0,670
hsa-miR-744-5p*	0,085 (0,058-0,163)	0,065 (0,056-0,092)	0,217
hsa-miR-486-5p	174,792 (156,884- 279,256)	143,454 (109,366- 203,374)	0,095
hsa-miR-146a-5p	0,027 (0,016-0,034)	0,020 (0,006-0,027)	0,117
hsa-miR-30a-5p*	1,248 (0,920-1,497)	0,839 (0,526-1,292)	0,095
hsa-let-7g-5p*	0,269 (0,187-0,457)	0,159 (0,119-0,329)	0,061

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney e foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

*miRNAs com a mesma regulação de expressão do sequenciamento.

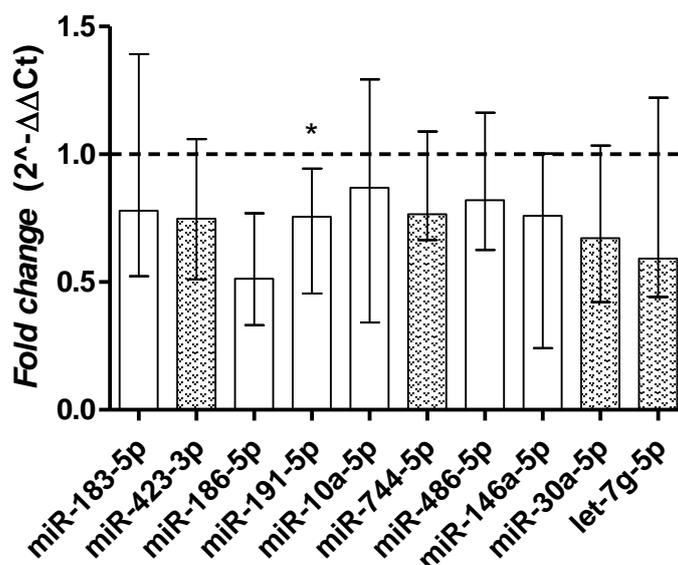


Figura 24. Gráfico de barras dos resultados de expressão relativa dos miRNAs mais ou menos expressos nas replicatas biológicas, correspondente ao perfil de pacientes não respondedores ao AAS e ao clopidogrel. As barras demonstram os valores de mediana e de intervalo interquartil dos resultados de expressão ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. Assinaladas com asterisco estão as barras que representam miRNAs com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Em cinza estão representados os miRNAs que tiveram suas expressões reguladas em acordo com o sequenciamento.

Sendo assim, houve confirmação do controle de expressão dos miRNAs hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p, sendo que hsa-let-7g-5p tendeu a ser diferentemente expresso entre os grupos ($p=0,061$).

Para verificar as vias relacionadas com os 4 miRNAs que apresentaram regulação de expressão semelhante entre o sequenciamento e a qPCR, utilizou-se a ferramenta de filtragem de alvos e de predição de atividade molecular (MAP) do software Ingenuity®, dando-se preferência aos alvos experimentalmente observados e altamente preditos relacionados com doenças cardiovasculares e inflamatórias e presentes em plaquetas. Dessa maneira, observou-se que, quando regulados negativamente em conjunto, os miRNAs hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p estiveram relacionados com o aumento da agregação plaquetária (**figura 25**).

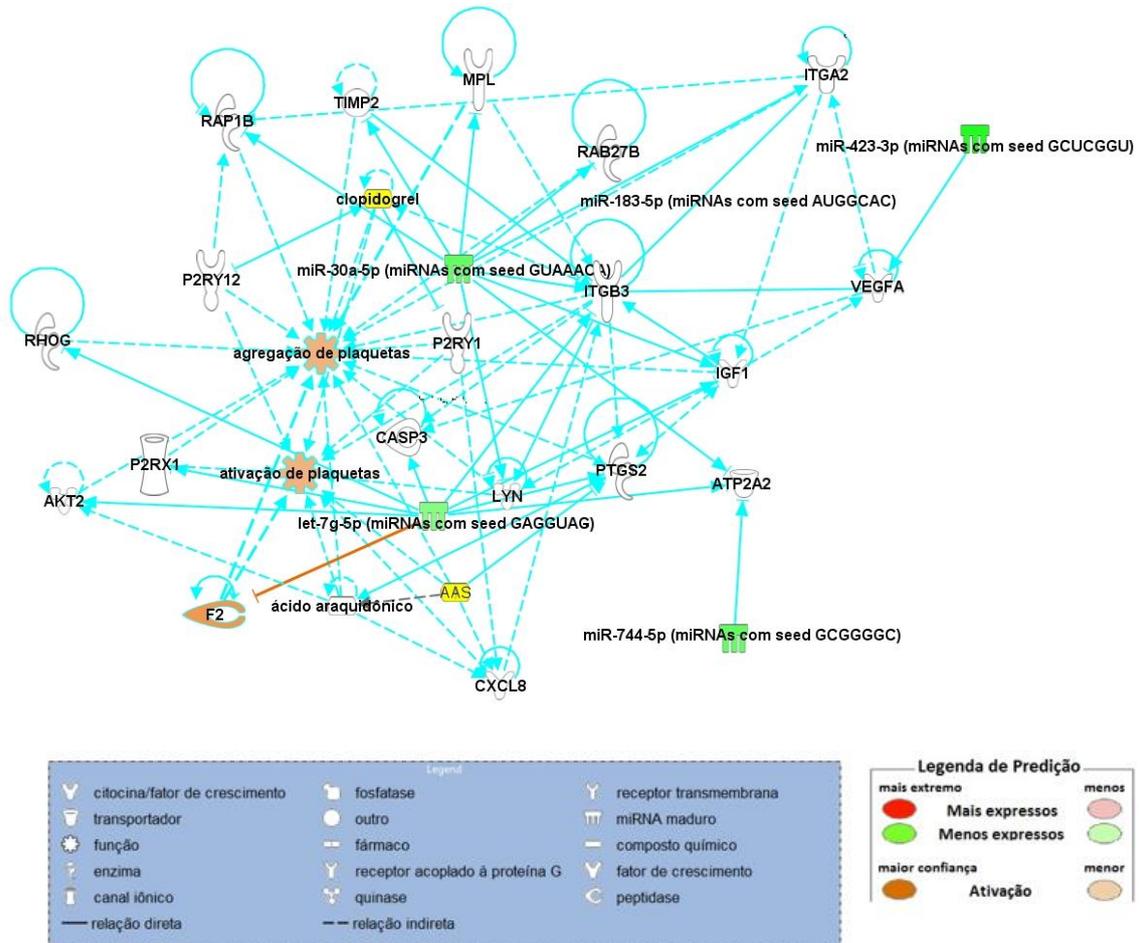


Figura 25. Diagrama de análise bioinformática no *software Ingenuity®*, mostrando os alvos dos miRNAs com perfis de expressão semelhantes entre o sequenciamento e a qPCR e alguns de seus genes-alvo experimentalmente observados ou preditos que, em conjunto, estão relacionados a uma ativação da agregação plaquetária. AAS, ácido acetilssalicílico; AKT2, Oncogene viral do timoma murino v-akt homólogo 2; ATP2A2, ATPase transportadora de cálcio do músculo cardíaco de contração lenta 2; CASP3, Caspase-3; CXCL8, Interleucina-8; F2, Fator II de coagulação (trombina); IGF1, Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (Somatomedina C); ITGA2, Integrina α -2; ITGB3, Integrina β -3; LYN, LYN proto-oncogene da família Src de tirosina quinase; MPL, MPL proto-oncogene receptor de trombopoietina; PTGS2, Prostaglandina-Endoperóxido Sintase 2; P2RY1, Receptor Purinérgico P2Y-1 acoplado à proteína G; P2RY12, Receptor Purinérgico P2Y-12 acoplado à proteína G; P2RX4, Receptor purinérgico P2X, canal iônico 4; RAB27B, Membro RAS da família oncogênica; RAP1B, Membro RAS da família oncogênica; RHOG, Membro G da família de homólogos ras; TIMP2, Inibidor 2 da metalopeptidase TIMP; VEGFA, Fator de crescimento A do endotélio vascular. Em amarelo estão destacados os dois antiagregantes plaquetários AAS e clopidogrel.

4.3.3 Análise da expressão diferencial dos miRNAs no grupo total de pacientes

De modo a analisar o perfil de expressão de hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p no grupo de pacientes como um todo, foram realizados testes para verificar se houve correlação desses miRNAs com

as variáveis laboratoriais (**tabela 19**) e analisou-se se houve diferenças no perfil de expressão dos miRNAs entre as categorias de fatores de risco e de medicamentos concomitantemente administrados (**figuras 26 e 27**).

Tabela 19. Correlação dos valores de expressão dos miRNAs hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p com as variáveis laboratoriais

Variáveis (n)	hsa-miR-423-3p		hsa-miR-744-5p		has-miR-30a-5p		hsa-let-7g-5p	
	r	p	r	p	r	p	r	p
ASPIteste (120)	-0,171	0,063	-0,186	0,042	-0,072	0,433	-0,198	0,030
ADPteste (120)	-0,229	0,012	-0,251	0,006	-0,041	0,657	-0,125	0,175
TRAPteste (120)	-0,267	0,003	-0,123	0,181	-0,080	0,384	-0,085	0,357
IMC (120)	-0,094	0,306	-0,006	0,948	-0,053	0,543	0,125	0,175
TLDC (117)	-0,036	0,697	-0,195	0,035	-0,092	0,326	-0,181	0,051
TLDA (119)	0,025	0,789	0,055	0,552	0,131	0,157	0,064	0,492
Hemoglobina (120)	-0,256	0,005	-0,175	0,056	-0,092	0,315	-0,034	0,716
Hematócrito (120)	-0,166	0,070	-0,083	0,366	-0,030	0,749	0,083	0,369
Plaquetas (120)	-0,090	0,328	-0,044	0,632	-0,115	0,212	0,036	0,695
Leucócitos (120)	-0,264	0,004	-0,053	0,568	-0,018	0,847	0,086	0,350
Fibrinogênio (119)	0,068	0,462	0,162	0,079	0,047	0,609	0,147	0,110
Glicose (120)	-0,121	0,189	-0,124	0,177	-0,019	0,837	-0,092	0,317
Creatinina (120)	-0,065	0,481	0,059	0,524	0,126	0,169	-0,008	0,930
Colesterol total (120)	-0,227	0,013	-0,146	0,111	0,166	0,070	-0,107	0,244
HDLc (120)	0,135	0,143	0,194	0,034	0,026	0,779	0,089	0,334
LDLc (118)	-0,107	0,248	-0,050	0,593	0,167	0,071	-0,014	0,881
VLDLc (116)	-0,341	<0,001	-0,324	<0,001	0,047	0,617	-0,198	0,033
Triglicérides (120)	-0,395	<0,001	-0,371	<0,001	0,029	0,754	-0,235	0,010
Ácido úrico (120)	-0,123	0,182	0,044	0,631	0,062	0,502	0,065	0,477
AST (120)	0,076	0,407	0,119	0,196	0,017	0,852	0,122	0,184
ALT (118)	0,024	0,796	0,070	0,452	-0,017	0,851	0,034	0,711
PCRus (118)	-0,060	0,517	-0,011	0,908	-0,048	0,606	0,199	0,031

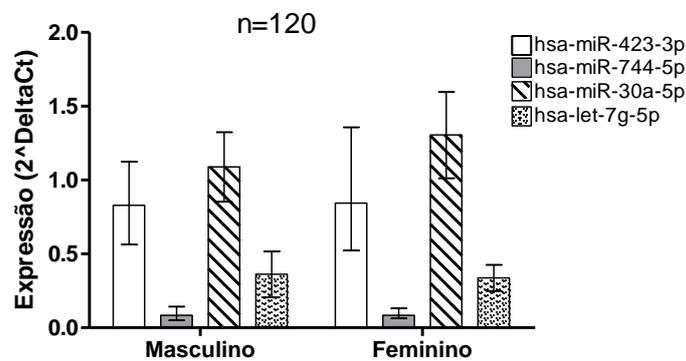
Para a análise foi realizado o teste de correlação de Spearman (r). Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; HDLc, colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC, Índice de Massa Corporal; LDLc, Colesterol da lipoproteína de baixa densidade; PCRus, Proteína C-reativa ultrasensível; TLDA, Tempo da última dose de AAS; TLDC, Tempo da última dose de clopidogrel; VLDLc, Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Ao avaliar a correlação dos miRNAs com a resposta ao AAS e ao clopidogrel, observou-se que hsa-miR-744-5p estava correlacionado negativamente com os valores de agregação para ambos os medicamentos,

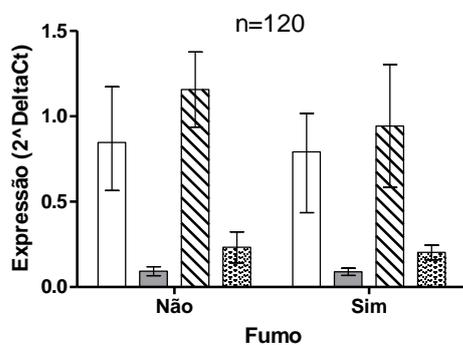
enquanto hsa-miR-423-3p estava correlacionado somente com o ADPteste, com uma tendência em correlacionar-se com o ASPIteste, e hsa-let-7g-5p somente correlacionou-se com os valores de ASPIteste. O miRNA hsa-miR-30a-5p não se apresentou correlacionado com nenhuma das variáveis laboratoriais.

Dos quatro miRNAs, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p e hsa-let-7g-5p apresentaram uma correlação negativa com o perfil lipídico, o que compreende justamente as variáveis laboratoriais que exerceram influência na obtenção de valores compreendidos no T3 de resposta ao AAS e ao clopidogrel (**tabela 19**).

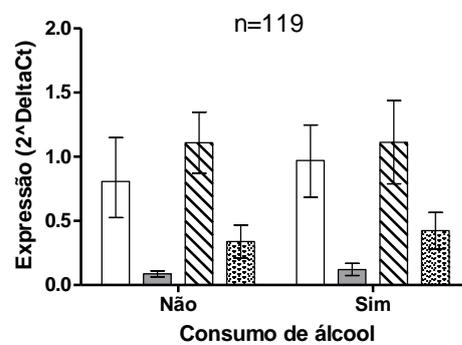
A



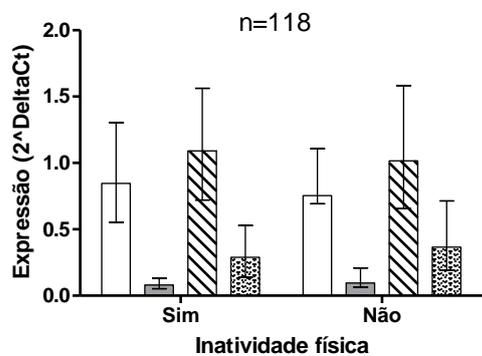
B



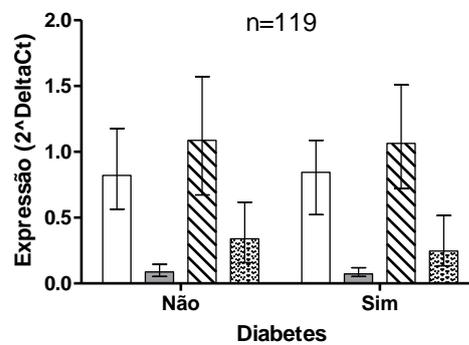
C



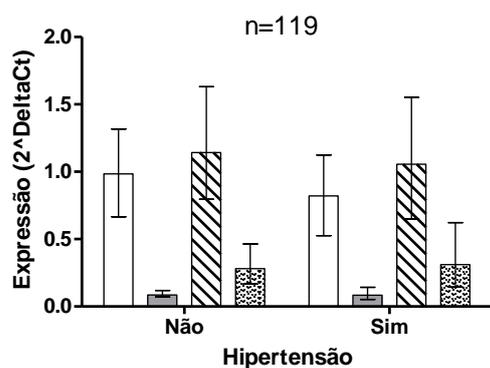
D



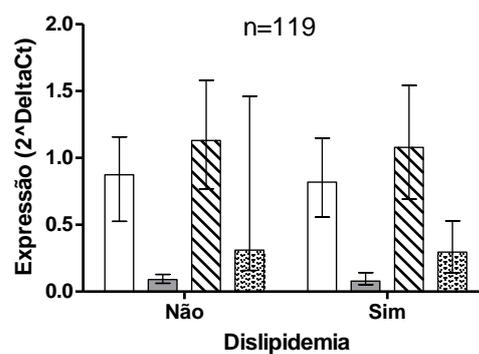
E



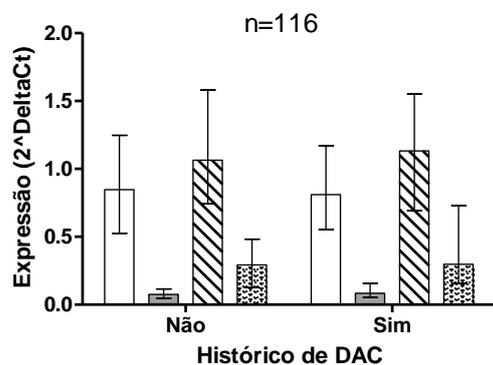
F



G



H



I

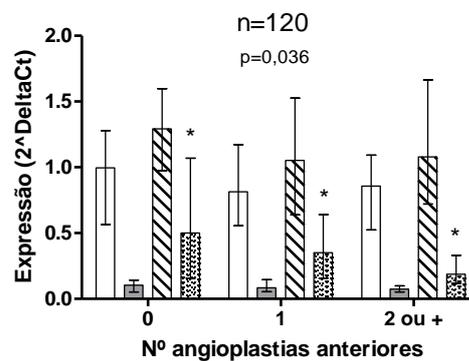


Figura 26. Distribuição dos valores de expressão de hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p entre as categorias dos fatores de risco para DAC. Os valores representam a mediana e os intervalos interquartílicos. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$ (*). Valores sem significância estatística não foram reportados. DAC, Doença arterial coronariana.

Verificou-se, através dos gráficos de distribuição da expressão dos miRNAs entre as categorias de fatores de risco, que o hsa-let-7g-5p mostrou-se associado ao número de angioplastias anteriores. Pacientes com 2 angioplastias anteriores ou mais apresentaram menor expressão de hsa-let-7g-5p do que aqueles com 1 ou nenhuma angioplastia anterior ($p=0,036$) (figura 26).

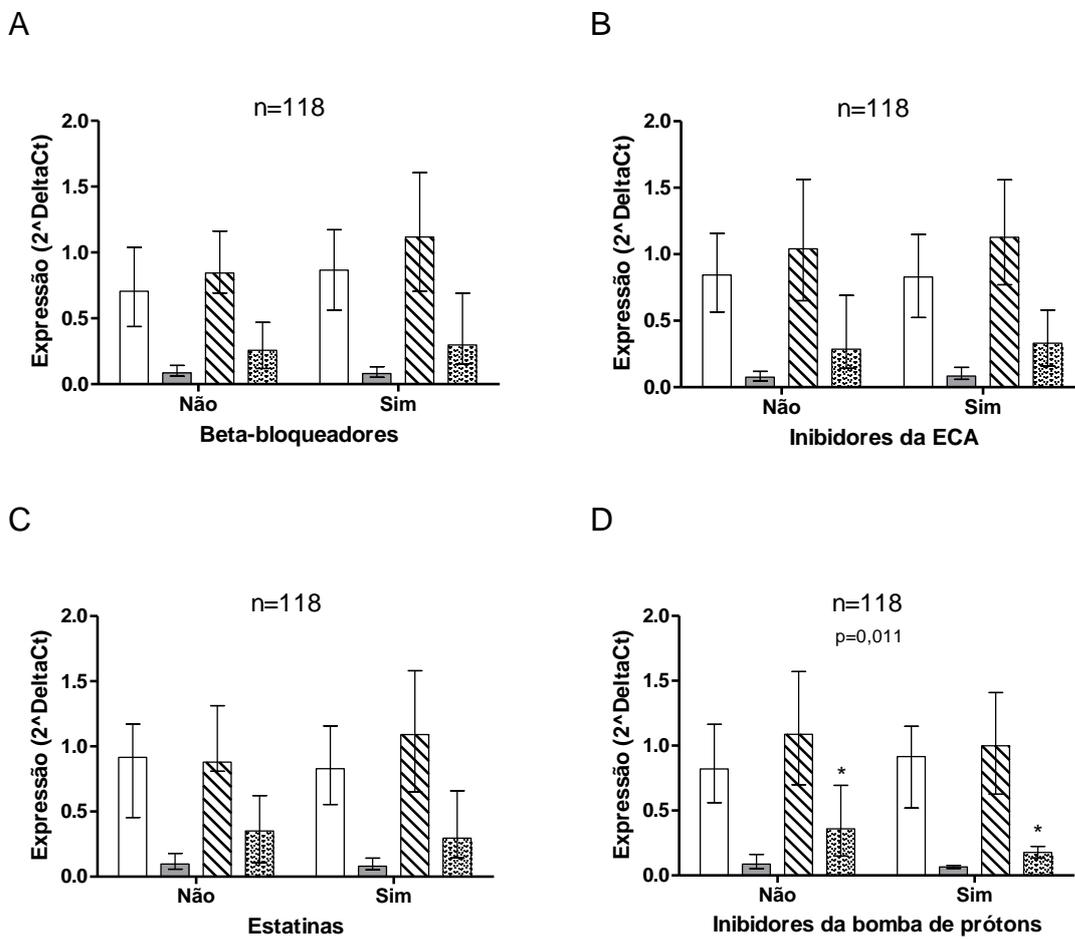


Figura 27. Distribuição dos valores de expressão de hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p entre as categorias de uso de medicamentos concomitantemente administrados. A identificação de cada miRNA está de acordo com a figura 26. Para a análise foi realizado o teste de Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$ (*). Somente foram assinaladas diferenças estatisticamente significativas. ECA, Enzima conversora de angiotensina.

Além disso, pôde-se observar que os valores de expressão de hsa-let-7g-5p estavam menores nos pacientes em terapia com inibidores da bomba de

prótons quando comparados com aqueles pacientes que não utilizavam esses medicamentos ($p=0,011$) (**figura 27D**). Ao mesmo tempo, hsa-miR-744-5p apresentou uma tendência de valores de expressão significativamente menores também nos pacientes em terapia com inibidores da bomba de prótons ($p=0,053$).

Pelo fato de a maioria dos miRNAs apresentar correlação com o perfil lipídico dos pacientes, realizou-se a análise de regressão logística binária univariada, onde pôde-se observar que um aumento dos valores de expressão de hsa-let-7g-5p (covariável) diminuiu a chance de o paciente apresentar-se como dislipidêmico (variável dependente), ao mesmo tempo em que foi encontrada uma diminuição da chance de o paciente apresentar dosagens de colesterol acima ou iguais a 200mg/dL quando há um aumento da expressão de hsa-miR-744-5p (**tabela 20, figura 28**).

Através das tabelas 19 e 20, podemos observar que, embora haja uma correlação negativa dos miRNAs com os valores de VLDLc e triglicérides, os mesmos parecem não influenciar na obtenção de valores de triglicérides abaixo de 150mg/dL. Do mesmo modo, o hsa-miR-423-3p mostra uma correlação negativa com os valores de colesterol total, mas não exerce influência sobre a obtenção de valores abaixo de 200mg/dL. Isso pode ser devido à presença de variáveis que não foram identificadas.

Tabela 20. Análise univariada da influência de hsa-let-7g-5p, hsa-miR-744-5p e hsa-miR-30a-5p no perfil lipídico dos pacientes

	<i>hsa-let-7g-5p</i>		
	<i>Odds ratio</i>	<i>IC95%</i>	<i>p</i>
Dislipidemia (n=119)	0,449	0,203-0,992	0,048
Colesterol < 200mg/dL (n=120)	1,762	0,646-4,802	0,268
LDLc ≤ 160mg/dL (n=120)	0,969	0,272-3,450	0,961
Triglicérides ≤ 150mg/dL (n=120)	2,007	0,876-4,599	0,100
	<i>hsa-miR-744-5p</i> *		
	<i>Odds ratio</i>	<i>IC95%</i>	<i>p</i>
Dislipidemia (n=119)	1,113	0,779-1,590	0,558
Colesterol < 200mg/dL (n=120)	2,360	1,083-5,142	0,031
HDLc ≥ 40mg/dL (n=120)	1,450	0,982-2,141	0,061
LDLc ≤ 160mg/dL (n=120)	1,299	0,612-2,755	0,496
	<i>hsa-miR-423-3p</i>		
	<i>Odds ratio</i>	<i>IC95%</i>	<i>p</i>
Dislipidemia (n=119)	1,019	0,506-2,051	0,958
Colesterol < 200mg/dL (n=120)	2,199	0,823-5,872	0,116
HDLc ≥ 40mg/dL (n=120)	1,656	0,834-3,288	0,149
LDLc ≤ 160mg/dL (n=120)	0,680	0,277-1,672	0,401

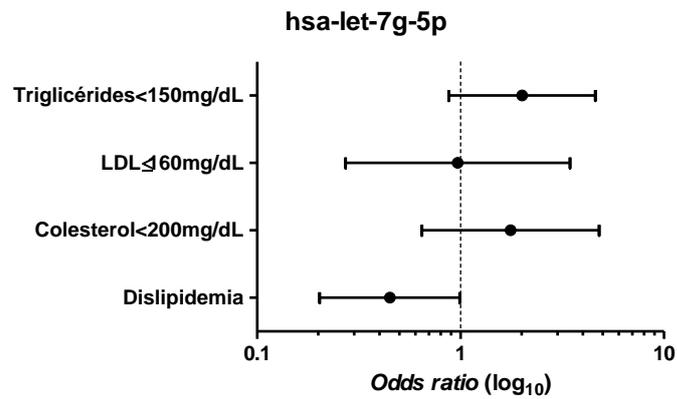
Para a análise de influência dos miRNAs no perfil lipídico dos pacientes foi utilizada a regressão logística binária univariada, com o método *Enter*. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. Os valores utilizados para categorizar as variáveis foram retirados da V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (Xavier *et al.*, 2013). HDLc, colesterol da lipoproteína de alta densidade; IC95%, Intervalo de confiança de 95%; LDLc, colesterol da lipoproteína de baixa densidade.

*Valores de expressão foram multiplicados por 10 para a análise de regressão, e devem ser interpretados como 1/10 de aumento na unidade de expressão.

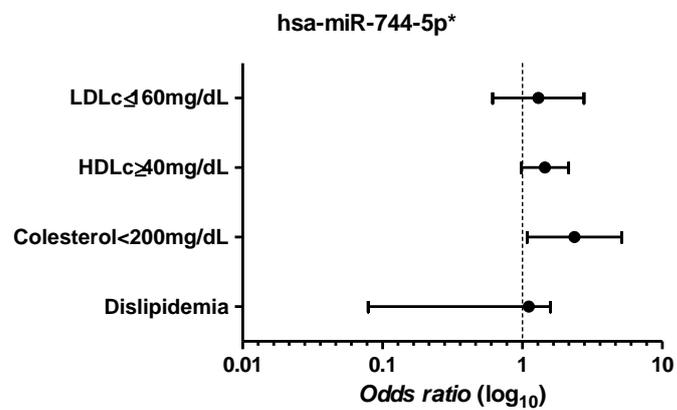
No entanto, a expressão de hsa-miR-744-5p mostrou correlação positiva com os valores de HDLc e mostra tendência em contribuir no aumento das dosagens de HDLc (**tabela 20, figura 28B**). Além disso, esse miRNA mostrou influenciar na obtenção de dosagens de colesterol abaixo de 200mg/dL.

Não houve ajuste do modelo de regressão quando avaliadas as influências de hsa-let-7g-5p sobre as dosagens de HDLc ≥ 40mg/dL, e de hsa-miR-744-5p e hsa-miR-423-3p sobre as dosagens de triglicérides < 150mg/dL. Sendo assim, seus valores não foram reportados nos gráficos e tabelas.

A



B



C

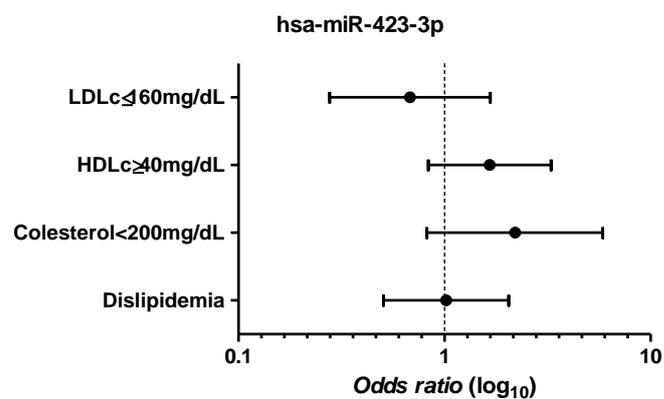


Figura 28. Gráficos de metanálise representando o efeito da expressão ($2^{\Delta Ct}$) de hsa-let-7g-5p (A), hsa-miR-744-5p (B) e hsa-miR-423-3p (C) sobre os perfis lipídicos característicos de dislipidemia. O gráfico representa os valores de *odds ratio* e do intervalo de confiança de 25% (IC25%). Os valores utilizados para categorizar as variáveis foram retirados da V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (Xavier *et al.*, 2013). HDLc, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDLc, colesterol da lipoproteína de baixa densidade. * Valores de expressão foram multiplicados por 10 para a análise de regressão, e devem ser interpretados como 1/10 de aumento na unidade de expressão.

A expressão de hsa-miR-744-5p encontrou-se menor em pacientes com dosagens de colesterol ≥ 200 mg/dL e maior no grupo de pacientes com HDLc ≥ 40 mg/dL, com diferenças estatisticamente significativas (figura 29, tabela 21).

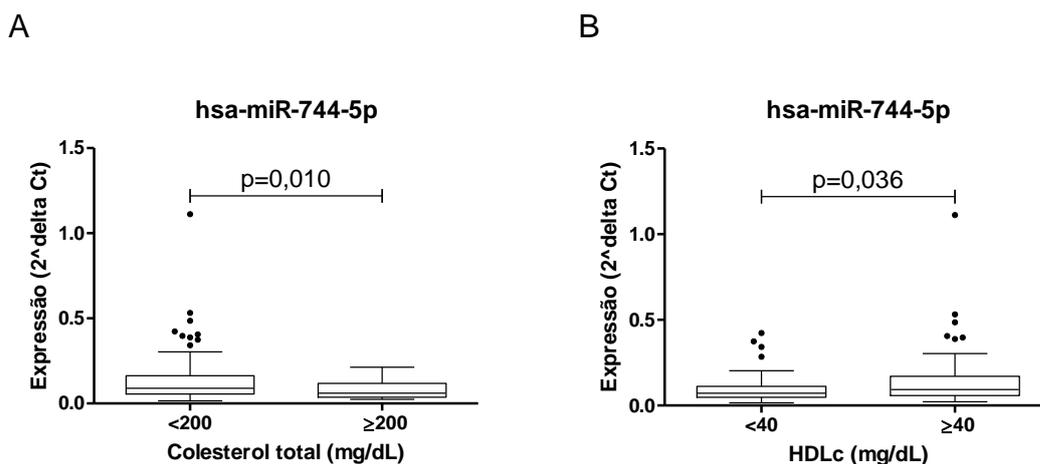


Figura 29. Valores de expressão de hsa-miR-744-5p entre as categorias dosagem de colesterol total e dosagem de HDLc. A, Valores de expressão de hsa-let-7g-5p no grupo de pacientes com DAC dislipidêmicos e não dislipidêmicos; B, Valores de expressão de hsa-miR-744-5p nas categorias de dosagem de colesterol total; C, Valores de expressão de hsa-miR-744-5p nas categorias de dosagem de HDLc. Para a análise de diferença de expressão entre os grupos foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram considerados diferentemente significativos os valores de $p < 0,05$. Os pontos pretos representam valores *outliers*.

Tabela 21. Valores de expressão de hsa-let-7g-5p e hsa-miR-744-5p nas categorias de pacientes dislipidêmicos e não dislipidêmicos e nas categorias de dosagem colesterol total e HDLc, respectivamente

<i>hsa-let-7g-5p</i>		
<i>Dislipidemia</i>	Expressão (2^{Δ} Ct)	p
Não	0,311 (0,159-1,462)	0,573
Sim	0,296 (0,140-0,530)	
<i>hsa-miR-744-5p</i>		
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	Expressão (2^{Δ} Ct)	p
<200	0,089 (0,056-0,157)	0,010
≥ 200	0,061 (0,036-0,118)	
<i>HDLc (mg/dL)</i>	Expressão (2^{Δ} Ct)	p
≥ 40	0,093 (0,058-0,170)	0,036
<40	0,072 (0,049-0,112)	

Os valores de expressão dos miRNAs estão representados pela mediana (intervalo interquartilico). Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros clínicos e laboratoriais X resposta aos antiagregantes plaquetários

O papel principal das plaquetas é interagir com o tecido epitelial, preservando sua função biológica, e recrutar leucócitos para os locais de inflamação. Isso é possível devido às propriedades adesivas das plaquetas e à possibilidade de responderem rapidamente à estímulos de ativação. Porém, a reação exagerada das plaquetas nos locais susceptíveis ao desenvolvimento da aterosclerose é um fator de extrema importância ao surgimento do trombo (Kaplan e Jackson, 2011; Siddiqui, Kumar e Dikshit, 2013).

A estreita relação entre a atividade plaquetária e o desenvolvimento da aterosclerose, com consequente manifestação da DAC, tem estabelecido que os antiplaquetários podem ser utilizados comumente na quimioprofilaxia (Varenhorst *et al.*, 2013; Lee, 2015). O receptor P2RY12 de ADP na superfície das plaquetas é um dos principais alvos da terapia antiagregante. Esse receptor está predominantemente presente na superfície de plaquetas, o que o faz um alvo permanente de estudos envolvendo fármacos antiplaquetários, como o clopidogrel (Siddiqui, Kumar e Dikshit, 2013).

De forma semelhante, o TXA2 é alvo indireto do AAS, o qual diminui sua síntese através da inibição da COX-1 plaquetária (Fontana *et al.*, 2013). Esse medicamento tem sido utilizado clinicamente por décadas e tem a capacidade de agir tanto na prevenção primária quanto na secundária do infarto agudo do miocárdio, diminuindo sua incidência e o risco de novos eventos (Duffy *et al.*, 2014).

Com isso, estudos clínicos avaliando a eficácia das terapias antiplaquetárias têm mostrado que a utilização do clopidogrel associado ao AAS, ao invés da utilização de um único antiagregante, tem contribuído ainda mais na diminuição da chance de eventos cardiovasculares (Bollati, Gaita e Anselmino, 2011). Os efeitos benéficos da dupla antiagregação se estendem com benefícios inclusive no tratamento de pacientes com DAC submetidos a implante de *stents* (Nicolau *et al.*, 2007; Piegas *et al.*, 2009; Müller, 2012; Steg *et al.*, 2012)

O estabelecimento da utilização da terapia dupla com antiplaquetários, principalmente em pacientes com SCA, reduziu drasticamente os eventos isquêmicos recorrentes, embora uma porcentagem desses eventos seja recorrente em curto e em longo prazo, decorrente da alta reatividade plaquetária residual, consequência da resposta inadequada à terapia (Parodi *et al.*, 2011; Garabedian e Alam, 2013).

Não há consenso na literatura sobre um valor de corte determinado para classificar os casos de resistência ou baixa resposta aos antiplaquetários como o clopidogrel e o AAS, porém, um estudo de Bonello e colaboradores (2010), baseando-se em resultados de pesquisas anteriores, determinou que valores $\geq 468 \text{UA}^* \text{min}$ em resposta ao ADP teste, avaliados pelo equipamento *Multiplate® Analyzer*, estariam relacionados a alta reatividade plaquetária residual.

Do mesmo modo, a reatividade plaquetária residual induzida pelo ácido araquidônico em testes de agregação plaquetária também está presente em pacientes com dupla terapia de antiagregação. Evidências mostram que

marcadores inflamatórios como a interleucina-6 (IL-6) e a PCRus podem estar independentemente associados à essa reatividade (Gremmel *et al.*, 2013).

No presente estudo, os tercis de resposta aos medicamentos AAS e clopidogrel foram baseados nos resultados dos testes de agregação plaquetária, com a adição dos agonistas ácido araquidônico e ADP, respectivamente, utilizando-se o equipamento *Multiplate®*. Pôde-se verificar que o valor da mediana do grupo T3 de resposta ao clopidogrel (495UA*min) apresentou-se próximo do valor estabelecido no estudo de Bonello e colaboradores (2010). Esses pacientes foram os que apresentaram os maiores valores de taxa de agregação, mesmo após uma dose de ataque de 300mg de clopidogrel.

Não houve correlação entre os medicamentos concomitantemente administrados e a resposta ao AAS e ao clopidogrel (**tabelas 3 e 10**, respectivamente). Esses resultados são semelhantes ao estudo de Ibrahim e colaboradores (2013) com pacientes com DAC sob dupla terapia de antiagregação, onde a taxa de agregação plaquetária também foi avaliada pelo equipamento *Multiplate®*.

Dentre as características clínicas e fatores de risco, o sexo e o histórico familiar de DAC mostraram diferença significativa entre os tercis de resposta ao AAS ($p=0,031$ e $p=0,027$, respectivamente). A maioria do sexo feminino obteve valores de taxa de agregação categorizados no T1, enquanto que a maioria do sexo masculino foi categorizada no T2. A grande maioria dos pacientes era do sexo masculino, contudo, isso não apresentou influência no aumento dos valores da taxa de agregação plaquetária ao AAS.

O histórico familiar de DAC mostrou exercer influência sobre a resposta ao AAS, independentemente de outros fatores. Pacientes com histórico familiar apresentaram quase seis vezes mais chances de obterem valores compreendidos no T3 de resposta ao AAS (O.R.=5,737; IC95%=1,762-18,678; $p=0,004$, **tabela 6**).

Em um estudo de Williams e colaboradores (2001) envolvendo diversas famílias, verificou-se que 72% dos pacientes com DAC prematura apresentavam histórico familiar e, além disso, esse fator de risco esteve presente em 48% de todos os casos estudados, envolvendo DAC prematura ou não. Isso se assemelha aos resultados encontrados neste estudo, onde 45,6% do grupo total de pacientes afirmaram ter pais ou irmãos com DAC (**tabelas 1 e 8**). Porém, observou-se que há menos envolvimento de fatores genéticos quanto mais tardia for a evidência de DAC (Marenberg *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2001).

Há evidências de que um aumento da reatividade plaquetária esteja fortemente associado com histórico familiar de DAC. Num estudo com pacientes apresentando histórico familiar bem pronunciado, a variabilidade na resposta ao AAS mostrou estar mais relacionada geneticamente com vias independentes da COX-1, como pela produção de tromboxana por células endoteliais ou por outros mecanismos, do que com as próprias vias relacionadas a essa enzima. Além disso, os fatores genéticos demonstraram maior impacto na variabilidade da resposta do que outros fatores de risco. Porém, os polimorfismos e genes relacionados com essa variabilidade nesses pacientes ainda não foram bem estabelecidos (Faraday *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi observado que o aumento da dosagem de hemoglobina foi independentemente preditor de diminuição na resposta ao AAS. Embora outras pesquisas tenham demonstrado uma relação inversa (Lee *et al.*, 2005; Lev *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009), uma correlação do aumento dos valores de Hb e resistência ao AAS já foi reportada (Neubauer *et al.*, 2011).

Esse parece ser o primeiro estudo mostrando influência independente do aumento dos valores de Hb sobre os valores de agregação em resposta à aspirina. Alguns estudos têm mostrado que baixos valores de Hb estão relacionados com pior prognóstico de DAC (Arant *et al.*, 2004; Sabatine *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2011; Grammer *et al.*, 2014), porém, não há ainda um consenso em relação à concentração de Hb que poderia influenciar no prognóstico.

No entanto, Chonchol e colaboradores (2008) buscaram determinar as concentrações de Hb relacionadas com aumento de chances de novos eventos em pacientes com DAC e verificaram que, tanto valores abaixo de 11,0g/dL quanto aquelas acima de 17,0g/dL estão envolvidos com o desenvolvimento da doença, demonstrando que a relação entre Hb e risco de DAC parece ser não linear, onde não somente a diminuição dos valores pode ser um fator de risco, mas também o aumento. Além disso, mostraram que valores entre 13,0g/dL e 15,0g/dL também se associaram a aumento das chances de DAC em 6%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Go e colaboradores (2006) em relação ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, onde demonstraram que valores abaixo de 13,0g/dL e acima de 17,0g/dL estiveram independentemente associados com essa doença.

Podemos observar que, no presente estudo, os valores de Hb encontram-se com um valor mediano de 14,2g/dL, num intervalo interquartilico de 13,1g/dL-15,1g/dL (**tabela 1**). Mesmo estando dentro dos valores normais, um aumento das concentrações nesse limite pode também estar relacionado com um pior prognóstico, embora não se saiba como seria esse mecanismo, assim como não se sabe como isso influenciaria na resposta ao AAS. Há a possibilidade de outros fatores não analisados estarem influenciando na obtenção desses achados.

Outra variável laboratorial que esteve independentemente associada a um aumento na reatividade plaquetária ao AAS foi o fibrinogênio (O.R.=1,007; IC95%=1,002-1,013; $p=0,008$; tabela 6). O fibrinogênio tem um papel importante na formação do trombo por se ligar ao receptor GPIIb/IIIa das plaquetas e promover a ligação cruzada entre elas (Marguerie *et al.*, 1984). Simultaneamente, o fibrinogênio se liga aos receptores de monócitos e neutrófilos, contribuindo no processo inflamatório (Mosesson, 2005) e favorecendo, assim, o processo aterosclerótico.

Altas concentrações de fibrinogênio plasmático foram associadas a um maior risco de eventos cardiovasculares, como o IAM, tanto em pacientes saudáveis quanto em pacientes de alto risco (Maresca *et al.*, 1999) e, associado à PCRus, o fibrinogênio foi considerado um biomarcador de aterosclerose em processo avançado (Kofoed *et al.*, 2003).

Um estudo piloto avaliou a taxa de agregação plaquetária por impedância elétrica, demonstrando que pacientes com AVC que foram considerados resistentes ao AAS apresentaram valores significativamente mais altos de fibrinogênio (Jastrzębska *et al.*, 2013).

Outro estudo realizado por Elsenberg e colaboradores (2009) relacionou maior concentração de fibrinogênio com alta reatividade plaquetária ao clopidogrel em pacientes em terapia associada com AAS, os quais foram selecionados para intervenção coronária percutânea. Essa relação não foi encontrada no presente estudo. Porém, estes mesmos autores afirmaram que a reatividade plaquetária esteve dependente dos diferentes testes de agregação avaliados, dentre os quais não fazia parte o *Multiplate*, e que cada teste foi significativamente influenciado por distintas características clínicas e laboratoriais.

No entanto, associação entre altas dosagens de fibrinogênio e resistência ao AAS já foram reportadas (Faraday *et al.*, 2006; Narvaez *et al.*, 2007; Sahin *et al.*, 2012), e isso pode estar associado com o aumento de adesividade eritrocitária e maior liberação de ADP em pacientes que apresentaram maiores dosagens de fibrinogênio, com conseqüente aumento da agregação plaquetária (Feher *et al.*, 2006).

Acredita-se que o AAS possa ter também uma atividade direta sobre o fibrinogênio através da acetilação dessas moléculas, com conseqüente quebra do coágulo de fibrina e aumento da permeabilidade (Undas, Brummel-Ziedins e Mann, 2007). Sendo assim, valores elevados de fibrinogênio poderiam interferir na ação do AAS, explicando alguns casos de falha na resposta a esse medicamento.

Em relação ao perfil lipídico dos pacientes, observou-se que esteve intimamente associado à resistência não somente ao AAS, mas também ao clopidogrel (tabelas 6 e 13). Porém, observa-se que há um contraste em

relação à influência das dosagens de triglicérides e de VLDLc com o aumento da resistência aos dois antiplaquetários.

Foi observado que, em pacientes diabéticos, há um acúmulo de colesterol na membrana das plaquetas e que isso leva a uma diminuição da resposta ao AAS devido à diminuição da fluidez de membrana. Porém, esse estado pode ser revertido com um aumento das concentrações de HDLc, o qual diminui as concentrações de colesterol das membranas, aumentando a resposta ao medicamento (Yalcinkaya e Celik, 2014). Esse fato pode explicar as dosagens de glicose mais baixas no T1 de resposta ao clopidogrel, que apresentou menores valores de agregação.

Além disso, pacientes após primeiro episódio de AVC, não necessariamente diabéticos, já mostraram resistência ao AAS associada com o aumento das dosagens de triglicérides (TG) plasmáticos, e acredita-se que isso possa estar relacionado com o aumento da rigidez plaquetária conferida pelo acúmulo de TG na membrana, o que impediria a ação do medicamento e o bloqueio efetivo da produção de TXA2 (Karepov *et al.*, 2008).

Por atuar no transporte reverso do colesterol das células espumosas para o fígado e bile, a HDL se torna essencial para a prevenção do desenvolvimento de DAC. Além disso, a HDL promove um aumento da produção de óxido nítrico pelas células endoteliais, com consequente diminuição da ativação plaquetária (Natarajan, Ray e Cannon, 2010). Ao mesmo tempo, sabe-se que, quanto maior for a relação TG/HDLc, maior é a taxa de mortalidade por doença isquêmica (Da Luz *et al.*, 2008; Bittner *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2015).

Pode-se observar que, entre os tercís de resposta ao AAS, os valores de HDLc mantiveram-se os mesmos, enquanto há uma tendência no aumento de TG. Ambos exercem influência sobre os valores de agregação plaquetária em resposta ao AAS, porém, a HDL se mostra benéfica enquanto o aumento dos triglicerídeos provoca o aumento da resistência ao AAS. Portanto, se houver aumento de triglicerídeos com manutenção/diminuição de valores de HDLc, a tendência é que haja diminuição na resposta ao AAS entre os tercís.

Mesmo que altas dosagens de LDLc não sejam encontradas, a relação TG/HDLc ainda se mostra preditora de doenças cardiovasculares, pois os pacientes podem estar em uso de medicamentos específicos para diminuição de valores de LDLc (Barter *et al.*, 2007). O aumento de TG/HDLc está relacionado com partículas menores e mais densas de LDL, as quais estão intimamente envolvidas no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (Dobiášová e Frohlich, 2001).

Curiosamente, observou-se que o aumento de TG esteve relacionado com melhora na resposta ao clopidogrel. O AAS precisa ser internalizado para exercer sua função, e a presença de TG na superfície plaquetária poderia estar levando à diminuição da resposta a esse fármaco. Além disso, o AAS pode competir com os ácidos graxos livres pela ligação à albumina (Bahar e Imai, 2013), os quais influenciam na síntese de TG (Kvilekval *et al.*, 1994). O mesmo não acontece com o clopidogrel, o qual atua através de bloqueio de receptores externos e não precisa ser internalizado pela plaqueta para exercer sua função.

Este parece ser o primeiro estudo que encontrou evidências de influência das concentrações de VLDLc na resposta à dupla terapia de antiagregação em pacientes com DAC. Podemos observar que essas

moléculas parecem estar relacionadas com uma melhora na resposta ao AAS, enquanto relaciona-se com uma piora na resposta ao clopidogrel (**tabelas 6 e 14**).

Estudos anteriores encontraram uma relação entre apolipoproteína E (apoE) e agregação plaquetária (Riddell, Graham e Owen, 1997; Pedreño *et al.*, 2000). Há indícios de que moléculas de VLDLc ricas em apoE levariam a uma diminuição da agregação plaquetária através da competição da apoE com a LDL pela ligação aos receptores de LDL na superfície das plaquetas, enquanto moléculas de VLDLc com pequenas quantidades de apoE levariam ao aumento da agregação plaquetária (Pedreño *et al.*, 2000).

Essa diminuição da agregação plaquetária induzida pela apoE afeta as vias de ADP, colágeno e epinefrina, mas não a via da trombina, e parece estar relacionada com o aumento da produção de óxido nítrico através da ativação da óxido nítrico sintase (Riddell, Graham e Owen, 1997).

Com esses achados, acreditamos que as composições de apolipoproteínas contidas nas moléculas de VLDLc podem estar diferentes quando analisamos os resultados de resposta aos dois antiplaquetários separadamente, o que estaria levando aos achados de diminuição de resposta ao clopidogrel e aumento de resposta ao AAS. Além disso, terapias com fibratos contribuem na diminuição das dosagens de apoE, aumentando a agregação plaquetária (Pedreño *et al.*, 2000). Isso também poderia explicar os achados encontrados do presente estudo, já que não obtivemos informações em relação à terapia com fibratos dos pacientes.

Como pôde ser observado, tanto os resultados de ASPIteste parecem exercer influência sobre os resultados de ADPteste (O.R.=1,005;

IC95%=1,002-1,008; $p=0,001$) quanto o contrário (O.R.=1,007; IC95%=1,004-1,010; $p<0,001$). Estudos anteriores com pacientes sob dupla terapia de antiagregação demonstraram que pacientes resistentes à ação do AAS são mais propensos a apresentarem ao mesmo tempo resistência ao clopidogrel (Lev *et al.*, 2006; Uzun *et al.*, 2015). Um dos mecanismos que explicaria esses achados é que, aparentemente, há um aumento da reatividade plaquetária em pacientes resistentes ao AAS devida à maior sensibilidade dos receptores GPIIb/IIIa ao ADP e ao colágeno (Lev *et al.*, 2006).

Uma evidência dessa interação é que o uso prolongado de AAS induz uma maior expressão da proteína-1 resistente a múltiplos medicamentos (MDR1) no intestino, afetando a absorção do clopidogrel, com consequente alteração da sua função antiplaquetária (Jung *et al.*, 2011).

Na avaliação da resposta ao clopidogrel, foram observadas diferenças significativas nas contagens de plaquetas e leucócitos entre os tercís de resposta ao ADPteste, assim como nas dosagens de AST e glicose ($p=0,047$; $p=0,001$; $p=0,028$; $p=0,049$, respectivamente). Porém, somente a contagem de leucócitos e a dosagem de AST estiveram correlacionadas com os valores de ADPteste compreendidos no T3 de resposta ($r=0,252$, $p=0,004$ e $r=-0,211$, $p=0,018$, respectivamente), e a contagem de plaquetas mostrou uma leve tendência a se correlacionar com os valores de agregação do ADPteste ($r=0,172$; $p=0,056$). Embora correlacionada, não houve influência das dosagens de AST na resistência ao clopidogrel.

Grau e colaboradores (2004) descreveram a correlação encontrada entre a contagem de leucócitos e recorrência de eventos isquêmicos em pacientes de alto risco sob terapia com AAS ou clopidogrel, incluindo os

pacientes com IAM. Além disso, a mesma correlação positiva entre valores de agregação avaliados pelo equipamento *Multiplate®* e as contagens de leucócitos em pacientes com DAC submetidos a implante de *stent* já foi reportada por Diehl e colaboradores (2010), os quais sugeriram que maiores contagens de leucócitos possam afetar a resposta ao clopidogrel por apresentarem também o receptor P2Y12.

As plaquetas e os leucócitos têm íntima relação com processos inflamatórios, como a aterosclerose. A adesão das plaquetas e o rolamento dos leucócitos no endotélio lesado podem dar início a um processo com evolução, aumentando a migração de leucócitos, incluindo os monócitos que, dependendo da gravidade da lesão, transformam-se em macrófagos e em células gordurosas, ou *foam cells*. A formação de complexos entre plaquetas e leucócitos com conseqüente agregação, em proporção significativa, pode levar à oclusão vascular aguda (Wagner e Frenette, 2008; Cerletti, De Gaetano e Lorenzet, 2010).

Sabe-se que os leucócitos recrutados conferem um aumento da ativação plaquetária a partir do recrutamento de plaquetas ativadas através da ligação de PSGL-1 (Proteína Ligante de P-Selectina-1) e P-selectina na superfície das plaquetas (Zarbock, Polanowska-Grabowska e Ley, 2007).

Por fim, observou-se uma influência dos valores de TRAPteste na obtenção dos valores de ADPteste, independentemente de outros fatores, onde um aumento nos valores de agregação de TRAPteste mostrou aumentar as chances dos pacientes em apresentarem valores de ADPteste no T3 de resposta ao clopidogrel, sendo então classificados como não respondedores a esse medicamento (**tabela 13**). Já foi descrito anteriormente que o clopidogrel

pode não inibir efetivamente a agregação plaquetária quando há uma indução da agregação pelo TRAP, o que acontece principalmente em situações onde há altas concentrações de trombina, como em casos de DAC (Matetzky *et al.*, 2004).

5.2 Sequenciamento dos miRNAs

Embora haja um grande potencial de utilização dos miRNAs do sangue total na discriminação de doenças, o seu valor preditivo alcança, em média, 67,45%. Isso pode ser devido à presença de comorbidades e de diferentes perfis de expressão entre as células sanguíneas (Schöler, Langer e Kuchenbauer, 2011).

Porém, devido ao fato de as plaquetas serem o segundo tipo celular mais abundante na circulação e serem capazes de liberar seus miRNAs a partir de microvesículas no sangue total (Willeit *et al.*, 2013), acredita-se que uma análise dos perfis de miRNAs no sangue possa contribuir na obtenção de biomarcadores de resposta à terapia com antiagregantes.

Através da análise do sangue total por sequenciamento de última geração, este estudo identificou dezoito miRNAs diferentemente expressos nos pacientes não respondedores quando comparados com pacientes respondedores à dupla terapia de antiagregação. Dos dez miRNAs escolhidos para serem analisados pela qPCR, quatro deles, que se apresentaram menos expressos no sequenciamento, apresentaram perfis de expressão semelhantes pela qPCR e foram confirmados: hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p (tabela 18, figura 24). Curiosamente, dentre os miRNAs

mais expressos em plaquetas identificados por sequenciamento encontram-se o hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p e o hsa-let-7g-5p, que faz parte da família hsa-let-7, responsável por 48% da expressão de miRNA plaquetária (Plé *et al.*, 2012).

Dentre os alvos experimentalmente observados de hsa-let-7g-5p (miRNAs com *seed* GAGGUAG) está a trombina (Fator II de coagulação) (Selbach *et al.*, 2008), o ativador mais potente de plaquetas, a qual tem um importante papel na formação do coágulo de fibrina. Quando em contato com as plaquetas, a trombina induz a adesão entre as plaquetas e provoca a secreção de substâncias presentes nos grânulos plaquetários, que amplificam a ativação e a agregação plaquetárias (Brass, 2003).

A diminuição na expressão desse miRNA pode estar contribuindo para o aumento de trombina e, conseqüentemente, favorecendo no aumento da agregação plaquetária dos pacientes compreendidos no T3 de resposta, diminuindo a resposta a ambos os antiplaquetários.

Outros dois alvos importantes que também estão relacionados com agregação e ativação plaquetárias são a integrina $\alpha 2$ (ITGA2) e a integrina $\beta 3$ (ITGB3). ITGB3 é alvo validado de hsa-let-7g-5p (miRNAs com *seed* GAGGUAG) (Müller e Bosserhoff, 2008) e predito de hsa-miR-30a-5p. ITGA2 é alvo experimentalmente observado somente de hsa-miR-30a-5p (Selbach *et al.*, 2008).

As integrinas ITGA2 e ITGB3, em conjunto, formam o heterodímero $\alpha_{II}\beta_{III}$, também conhecida como glicoproteína GPIIb/IIIa, restrita de linhagens celulares de megacariócitos, apresentando-se em aproximadamente 80.000

cópias na superfície das plaquetas não estimuladas, sendo que novas unidades são adicionadas à superfície durante a secreção de substâncias dos grânulos plaquetários. Esse heterodímero tem como principal ligante o fibrinogênio, que forma pontes ligando-se entre si e promovendo a agregação (Bennett, 2005).

Um dos ativadores de $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ é a trombina, através da sua ligação ao Receptor Ativado por Protease-1 (PAR-1) na superfície das plaquetas, com consequente ativação do heterodímero (Ye, Kim e Ginsberg, 2012). Uma pequena quantidade de trombina é suficiente para ativar seu receptor PAR-1, o qual leva à ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_{III}$, que também possui como ativadores o ADP e o TXA2 (Jennings, 2009), sendo que a síntese de TXA2 pelas plaquetas é potencialmente induzida também pela trombina (Sinha *et al.*, 1983).

A trombina parece exercer um papel importante também na secreção de interleucina 8 (IL-8) (Ludeman *et al.*, 2005). Essa interleucina possui dois receptores nas plaquetas, o CXCR1 e o CXCR2 os quais, quando ligados à IL-8, promovem processos inflamatórios, agregação plaquetária e a formação de trombo (Zarbock, Polanowska-Grabowska e Ley, 2007), que podem ser exacerbados em processos ateroscleróticos.

Podemos observar, na figura 24, que a proteína LYN é alvo predito de hsa-miR-30a-5p e as proteínas AKT2 e caspase-3 (CASP3) são alvos preditos e validados de hsa-let-7g-5p (miRNAs com região *seed* GAGGUAC), respectivamente (Tsang e Kwok, 2008). Possivelmente, essas proteínas podem estar com concentrações aumentadas devidas à diminuição de expressão desses dois miRNAs no T3 de resposta aos antiagregantes (**figuras 21 e 25**).

Sabe-se que a fosforilação de AKT pode ser desencadeada pela ligação da trombina aos seus receptores PAR-1 e PAR-4 na superfície das plaquetas (Reséndiz, Kroll e Lassila, 2007), assim como pelo TXA2 (Li *et al.*, 2003) e pelo colágeno (Barry e Gibbins, 2002) e que a manutenção da ativação de AKT é dependente de ADP (Reséndiz, Kroll e Lassila, 2007). Nas plaquetas, a isoforma AKT2 induz a exposição de p-selectina na superfície e a ativação do heterodímero $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ (Woulfe *et al.*, 2004), enquanto que nos neutrófilos essa mesma isoforma leva à liberação de Ca^{+2} intracelular e à ativação da integrina $\alpha\text{M}\beta\text{2}$, modulando as interações entre as plaquetas e os neutrófilos durante processos inflamatórios vasculares (Li *et al.*, 2014).

O aumento nas concentrações de LYN desencadeada por baixa expressão de hsa-miR-30a-5p também pode estar contribuindo com o aumento da agregação plaquetária, pois essa proteína induz a secreção de α -grânulos e de grânulos densos pelas plaquetas. Há evidências de que a agregação plaquetária induzida por colágeno, TXA2 e trombina é inibida quando a expressão dessa proteína é bloqueada (Li *et al.*, 2010).

Em relação à protease CASP3, foi demonstrada a sua presença nas plaquetas (Böing *et al.*, 2008). Essa protease está relacionada com ativação plaquetária através do estímulo da secreção de micropartículas e de fosfatidilserina, que contribuem para a formação do trombo. Assim como AKT e LYN, também pode ser ativada pela trombina, TXA2 e colágeno (Shcherbina e Remold-O'donnell, 1999; Rosado *et al.*, 2006).

Outro importante alvo predito de hsa-let-7g-5p (miRNAs com região *seed* GAGGUAC) e que pode estar envolvido no aumento da agregação plaquetária é a prostaglandina endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), mais conhecida como

ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Foi demonstrado que essa enzima está presente em plaquetas e pode ser uma fonte alternativa de TXA₂ (Tanaka *et al.*, 2004), o que poderia estar levando a uma resistência à aspirina (Weber *et al.*, 1999).

Esse miRNA também apresenta, como alvos preditos, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA), o receptor purinérgico P2X (P2RX1), a ATPase 2 (ATP2A2), a somatomedina C (IGF1) e, como alvo já experimentalmente observado, o membro g da família de homólogos rag (RHOG) (Selbach *et al.*, 2008). RHOG tem um importante papel na secreção dos grânulos densos das plaquetas, os quais contêm ADP, a partir do estímulo pelo colágeno. Além disso, RHOG está envolvido também na secreção de α -grânulos com consequente liberação de quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e fatores coagulantes, contribuindo no recrutamento de novas plaquetas para a formação do trombo (Goggs *et al.*, 2013; Goggs *et al.*, 2015).

P2RX1 é um canal iônico que permite a entrada de Ca⁺² no interior das plaquetas, mecanismo que pode ser ativado pela liberação de adenina trifosfato (ATP) e ADP de grânulos plaquetários em condições de alto cisalhamento e que é essencial para a formação inicial do trombo (Hechler *et al.*, 2003).

Outro componente dos grânulos plaquetários e que possui receptores na superfície das plaquetas é o IGF1 (Hers, 2007; Kim *et al.*, 2007). Essa molécula age na ativação plaquetária através da via de fosfoinosítideo 3-quinase (PI3-K) e pode potencializar os efeitos da agregação induzida por PAR-1 (Hers, 2007) assim como pela epinefrina (Kim *et al.*, 2007). Podemos observar, pela figura 24, que IGF1 é alvo tanto de hsa-let-7g-5p quanto de hsa-miR-30a-5p.

Além disso, as plaquetas também podem secretar VEGFA, o qual demonstrou ter um importante papel na ativação plaquetária via proteína quinase MAPK e PI3-K quando na presença de trombina. No entanto, esse fator de crescimento ao mesmo tempo é responsável por estimular a produção de prostaglandina I₂ e de óxido nítrico pelo endotélio vascular, e ambos atuam como agentes antiagregantes (Selheim, Holmsen e Vassbotn, 2002). Porém, por ser um alvo predito de hsa-miR-423-3p, que se encontra menos expresso em pacientes com maiores valores de agregação, o VEGFA poderia estar aumentado nesses pacientes e contribuindo para aumentar a resistência aos antiagregantes.

Além dos alvos de hsa-miR-30a-5p anteriormente citados, observamos que esse miRNA também pode regular a proteína RAP1B e RAB27B, membros da família de oncogene Ras, além do inibidor da metalopeptidase 2 (TIMP2) e do receptor de trombopoietina (MPL) (**figura 25**).

O papel de Rap1b na função plaquetária pôde ser melhor compreendido através de testes com camundongos nocautes para essa proteína, o que provocou uma diminuição da ativação da integrina α IIb β III (Chrzanowska-Wodnicka *et al.*, 2005). Além disso, na falta de Rap1b, há diminuição da liberação de ATP e da expressão de P-selectina induzidas por colágeno e trombina. Enquanto o papel de Rap1b parece estar mais relacionado com a liberação de α -grânulos (Zhang *et al.*, 2011), há evidências de que Rab27b tenha um importante papel na liberação e na biossíntese dos grânulos densos (Tolmachova *et al.*, 2007).

O receptor MPL, por sua vez, quando ativado simultaneamente com P2RY12, leva à ativação de α IIb β III (Campus *et al.*, 2005). Ao contrário, TIMP2

regula a ação da metaloproteinase 2 (MMP2) liberada pelos grânulos plaquetários, conferindo modulação da resposta através da inibição da ativação de MMP2 (Kazes *et al.*, 2000), podendo estar atenuando o processo de agregação.

O único alvo predito de hsa-miR-744-5p encontrado pela análise no *Ingenuity®* foi a ATPase ATP2A2, a qual não demonstrou até o momento relação com aumento de ativação e/ou agregação plaquetária, com consequente aumento da resistência aos antiplaquetários. Também não foram encontradas relações entre hsa-miR-744-5p e a resposta ao AAS e clopidogrel no banco de dados do *PharmacomiR* (Rukov *et al.*, 2014).

No entanto, pôde-se observar, através do estudo de predição de alvos dos miRNAs confirmados, que várias moléculas relacionadas com ativação e agregação plaquetária podem estar aumentadas nos pacientes que apresentaram maiores valores de agregação plaquetária, agindo independentemente das vias bloqueadas pelo AAS e pelo clopidogrel, o que pode explicar esses achados.

Um dos alvos encontrados e que exerce um papel central é a trombina, o principal ativador plaquetário que se mostra essencial na fase inicial da agregação e, por fim, leva à ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$, composta por ITGA2 e ITGA3, culminando na agregação plaquetária.

Além disso, pôde-se observar que hsa-miR-744-5p, hsa-miR-423-3p e hsa-let-7g-5p apresentaram correlações com os valores de ASPIteste e ADPteste e com o perfil lipídico dos pacientes (**tabela 19**). Tanto hsa-miR-744-5p quanto hsa-let-7g-5p demonstraram benefícios em relação ao perfil lipídico, pois parecem contribuir na obtenção de dosagens de colesterol total abaixo de

200mg/dL e na classificação dos pacientes como não dislipidêmicos, respectivamente (**tabela 20, figura 28A e 28B**).

Chen e colaboradores (2011) demonstraram que há uma diminuição da expressão de hsa-let-7g-5p no plasma de pacientes hipercolesterolêmicos quando comparados com pacientes sem hipercolesterolemia. Além disso, observaram que pacientes hipercolesterolêmicos com AVC apresentavam menor expressão desse miRNA do que pacientes não hipercolesterolêmicos com AVC, e mostraram que há um papel importante de hsa-let-7g-5p no controle da expressão dos receptores de LDL oxidada (LDLox), conhecidos como LOX-1. Sendo assim, esse miRNA teria uma importante função anti-aterosclerótica.

No presente estudo, observou-se que os pacientes com DAC dislipidêmicos, quando comparados com os não dislipidêmicos, apresentaram também menores valores de expressão de hsa-let-7g-5p no sangue total, embora essa não tenha sido uma diferença significativa ($p \geq 0,05$) (**figura 26G, tabela 21**). Em um tamanho amostral maior, talvez essa diferença possa se tornar evidente e mostrar a possibilidade de hsa-let-7g-5p estar agindo nos valores de agregação plaquetária através do perfil lipídico. Além disso, dentre os miRNAs com perfis de expressão semelhantes entre o sequenciamento e a qPCR, ele foi o único a mostrar uma tendência em ser diferentemente expresso quando avaliado pela qPCR (**tabela 18**).

Ao mesmo tempo, foi observada uma associação de hsa-let-7g-5p com a utilização de inibidores da bomba de prótons (**figura 27D**). Pacientes em terapia com esses medicamentos apresentaram menores valores de expressão desse miRNA quando comparados com os pacientes que não estavam em

terapia com inibidores da bomba de prótons ($p=0,011$). Porém, não foram até o momento reportadas associações entre esses medicamentos e hsa-let-7g-5p.

Na literatura, já foram identificadas diversas associações entre a utilização de inibidores da bomba de prótons – principalmente o omeprazol - e diminuição do efeito antiagregante do clopidogrel, pois ambos disputam por metabolização pela enzima hepática CYP2C19, embora essa relação possa vir de estudos de menor qualidade estatística (Drepper, Spahr e Frossard, 2012). Portanto, a utilização desses medicamentos possivelmente pode afetar a ação antiagregante pela disputa por enzimas metabolizadoras e pela modulação do perfil de miRNAs.

Não foram encontradas relações entre hsa-miR-744-5p e hsa-miR-423-3p e o perfil lipídico, obesidade ou dislipidemia na literatura. Dessa maneira, esse pode ser o primeiro estudo a demonstrar a relação entre esses miRNAs e as dosagens de colesterol e triglicérides entre pacientes com DAC. No entanto, estudos mais aprofundados poderão contribuir com um melhor entendimento dessa associação.

5.3 Comparação dos resultados de expressão de sequenciamento e da qPCR

A partir da análise da qPCR nas amostras sequenciadas, observou-se que 5 miRNAs obtiveram expressões semelhantes ao sequenciamento (**tabela 17, figura 22**) e, entre esses cinco, hsa-miR-744-5p e hsa-let-7g-5p mostraram correlação significativa (**figura 23**). Na análise da qPCR entre as replicatas biológicas, pôde-se verificar que hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p mostraram perfis de expressão semelhantes às

encontradas no sequenciamento e foram, então, confirmados, com hsa-let-7g-5p mostrando uma tendência em apresentar-se diferentemente expresso entre os tecidos T1 e T3 (**tabela 18, figura 24**).

Levando-se em consideração que 40% dos miRNAs foram confirmados pela qPCR neste estudo, onde 50% foram confirmados levando-se em consideração somente as amostras sequenciadas, verifica-se que há uma semelhança com a taxa de 54,6% de confirmação média de miRNAs diferentemente expressos quando qualquer combinação de duas tecnologias diferentes é comparada, incluindo sequenciamento, qPCR e *microarray*, segundo análise retrospectiva feita por Metsdagh e colaboradores (Metsdagh *et al.*, 2014). Além disso, diferentes métodos de normalização entre as tecnologias podem contribuir para a identificação de diferentes perfis de expressão de miRNAs (Meyer *et al.*, 2012).

Verificou-se que o método tradicional de normalização de qPCR (ΔCt) pode introduzir vieses quando se encontra correlação positiva entre os valores de Ct dos genes alvo e os genes de referência, inclusive na análise de expressão de miRNAs. Para corrigir os vieses introduzidos por esse método de análise, o qual foi utilizado no presente estudo, sugere-se que seja determinado o coeficiente de regressão para cada gene alvo e que esse coeficiente seja utilizado para ajustar os valores de ΔCt (Cui *et al.*, 2015).

Somando-se a esses fatores, a análise da qPCR foi realizada através da detecção dos miRNAs por *Sybr green*, o qual pode detectar isomirs e aumentar a quantidade de pontos que devem ser omitidos por apresentarem curva de dissociação não-específica (Tan, Khoo e Tan, 2015). Ademais, as plataformas de qPCR podem apresentar um viés quando há uma diferença de expressão

pequena entre os grupos, já que os resultados de Ct são fornecidos em escala logarítmica (Mestdagh *et al.*, 2014).

Por fim, dentre os miRNAs sequenciados, houve super expressão de um miRNA em particular, o hsa-miR-486-5p, o qual, no entanto, não foi confirmado pela qPCR (figura 24), porém, apresentou-se com valores de expressão bem maiores que os demais também por esse método. Sabe-se que o hsa-miR-486-5p é expresso por hemácias e pode estar presente em grandes quantidades em amostras hemolisadas (Pritchard, Cheng e Tewari, 2012). Como um dos objetivos do nosso estudo foi avaliar o perfil dos miRNAs em sangue total coletados em tubos *PaxGene*TM, que hemolisa hemácias, acredita-se que essa super expressão de hsa-miR-486-5p pode ter essa como uma das explicações.

No entanto, esse miRNA obteve uma expressão cinquenta vezes maior do que outros miRNAs sequenciados em um estudo realizado por Huang e colaboradores (2013) com exossomas de plasma, utilizando-se, como um dos kits de preparo, o kit *Truseq* para pequenos RNAs (*Illumina*, San Diego, EUA). Um dos objetivos do estudo foi comparar três plataformas de sequenciamento, inclusive a da *Illumina*, e observar o viés de cada uma. Não houve essa super expressão de hsa-miR-486-5p com as outras duas plataformas.

Outro estudo que buscou determinar o perfil de miRNAs no líquido mostrou que o mais expresso deles foi também o hsa-miR-486-5p, o qual foi dezenove vezes mais expresso do que o segundo mais expresso. Também, nesse caso, o kit utilizado para sequenciamento das amostras foi o *Truseq* para pequenos RNAs, da empresa *Illumina*.

Com isso, acreditamos que possa haver um viés na utilização desse kit de preparo de bibliotecas, pois o mesmo perfil de super-expressão de hsa-miR-

486-5p aparece em diferentes tipos de amostra. No entanto, esse possível viés ainda não foi confirmado.

Sendo assim, a quantidade de *reads* mapeadas para cada amostra pode não ter sido suficiente para uma análise adequada do perfil dos miRNAs pois foi avaliado que, com o aumento dessa quantidade, novos miRNAs podem ser identificados em amostras tanto de tecido quanto de fluidos biológicos, porém, podendo haver variações na quantidade de *reads* mapeadas principalmente em materiais como o plasma ou o sangue total, que contêm quantidades menores de miRNAs do que os tecidos (Metpally *et al.*, 2013).

Contudo, foi possível observar que houve diferenciação no perfil de miRNAs entre pacientes do T3 em relação ao T1, e que alguns desses miRNAs têm como alvos moléculas envolvidas na função plaquetária e mostram correlação com o perfil lipídico, o que poderia estar levando a uma resposta inadequada aos antiplaquetários AAS e clopidogrel na terapia dos pacientes com DAC do estudo. No entanto, como não houve comparação de perfis antes e depois da terapia antiagregante, não se sabe se essa diferença de perfil pode estar sendo influenciada pela própria terapia antiagregante em estudo (figura 30).

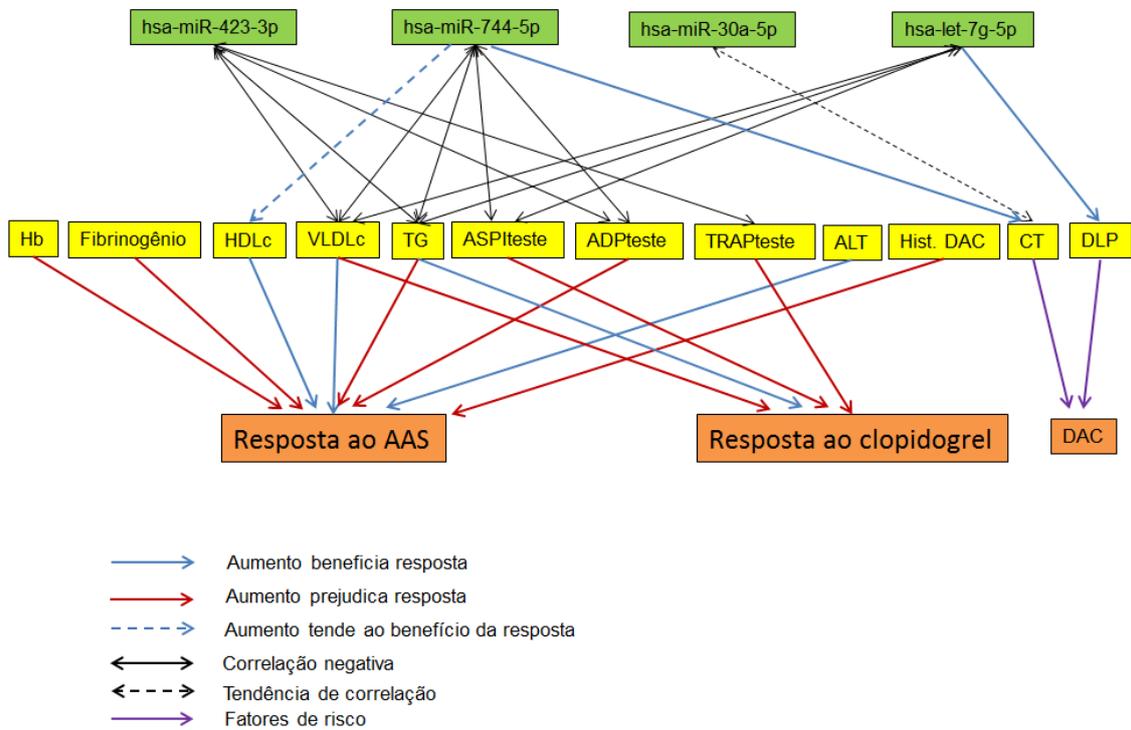


Figura 30. Interação dos miRNAs confirmados com os parâmetros laboratoriais e fatores de risco que influenciam na resposta antiagregante e no desenvolvimento de DAC. ADPtteste, Teste que utiliza o ADP como agonista para verificar resposta antiagregante ao clopidogrel; ALT, Alanina aminotransferase; ASPtteste, Teste que utiliza o ácido araquidônico como agonista para verificar resposta antiagregante ao AAS; CT, Colesterol total; DAC, Doença arterial coronariana; DLP, Dislipidemia; Hb, Hemoglobina; HDLc, Colesterol da lipoproteína de alta densidade; Hist. DAC, Histórico de DAC; TG, Triglicérides; VLDLc, Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

6 CONCLUSÃO

1. A análise do perfil de miRNAs no sangue total de pacientes com DAC pode caracterizar resposta inadequada à dupla terapia de antiagregação;
2. A falha na resposta ao clopidogrel, o aumento dos valores de ADPteste e o aumento das concentrações de Hb, fibrinogênio e TG, assim como o histórico de DAC, mostraram associação com pior resposta ao AAS; ao contrário, o aumento das concentrações de HDLc, VLDLc e ALT apresentaram benefícios à terapia com esse medicamento;
3. A falha na resposta ao AAS e resposta inadequada à via da trombina, assim como o aumento das concentrações de VLDLc, apresentaram associação com não resposta ao clopidogrel; por outro lado, o aumento das concentrações de TG beneficiou a resposta ao clopidogrel;
4. O aumento de expressão de hsa-miR-744-5p pode explicar a resposta terapêutica positiva ao AAS e ao clopidogrel através da sua influência na diminuição das concentrações de colesterol total;
5. O aumento de expressão de hsa-let-7g-5p pode explicar a resposta terapêutica positiva ao AAS por diminuir as chances de os pacientes serem dislipidêmicos;
6. A diminuição concomitante da expressão de hsa-miR-423-3p, hsa-miR-744-5p e, principalmente, hsa-miR-30a-5p e hsa-let-7g-5p pode contribuir na diminuição da resposta ao AAS e ao clopidogrel por apresentarem alvos relacionados à agregação, como a trombina e as

integrinas ITGA2 e ITGB3, além de moléculas que regulam a secreção de grânulos plaquetários.

7 REFERÊNCIAS

ANGIOLILLO, D. J. et al. Antiplatelet drug response variability and the role of platelet function testing: a practical guide for interventional cardiologists. **Catheter Cardiovasc Interv**, v. 73, n. 1, p. 1-14, Jan 2009. ISSN 1522-726X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089929> >.

ARANT, C. B. et al. Hemoglobin level is an independent predictor for adverse cardiovascular outcomes in women undergoing evaluation for chest pain: results from the National Heart, Lung, and Blood Institute Women's Ischemia Syndrome Evaluation Study. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 11, p. 2009-14, Jun 2004. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15172405> >.

BAHAR, F. G.; IMAI, T. Aspirin hydrolysis in human and experimental animal plasma and the effect of metal cations on hydrolase activities. **Drug Metab Dispos**, v. 41, n. 7, p. 1450-6, Jul 2013. ISSN 1521-009X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23649702> >.

BARRY, F. A.; GIBBINS, J. M. Protein kinase B is regulated in platelets by the collagen receptor glycoprotein VI. **J Biol Chem**, v. 277, n. 15, p. 12874-8, Apr 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825911> >.

BARTER, P. et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **N Engl J Med**, v. 357, n. 13, p. 1301-10, Sep 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17898099> >.

BENNETT, J. S. Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. **J Clin Invest**, v. 115, n. 12, p. 3363-9, Dec 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322781> >.

BHATT, D. L. et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. **N Engl J Med**, v. 354, n. 16, p. 1706-17, Apr 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531616> >.

BITTNER, V. et al. The triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio predicts all-cause mortality in women with suspected myocardial ischemia: a report from the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). **Am Heart J**, v. 157, n. 3, p. 548-55, Mar 2009. ISSN 1097-6744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249427> >.

BOLLATI, M.; GAITA, F.; ANSELMINO, M. **Antiplatelet combination for prevention of atherothrombotic events.** *Vascular Health and Risk Management*. 7: 23-30 p. 2011.

BONELLO, L. et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. **J Am Coll Cardiol**, v. 56, n. 12, p. 919-33, Sep 2010. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828644> >.

BRASS, L. F. Thrombin and platelet activation. **Chest**, v. 124, n. 3 Suppl, p. 18S-25S, Sep 2003. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970120> >.

BURR, M. L. et al. Haematological prognostic indices after myocardial infarction: evidence from the diet and reinfarction trial (DART). **Eur Heart J**, v. 13, n. 2, p. 166-70, Feb 1992. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313369> >.

BÖING, A. N. et al. Platelet microparticles contain active caspase 3. **Platelets**, v. 19, n. 2, p. 96-103, Mar 2008. ISSN 1369-1635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297548> >.

CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15524-9, Nov 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12434020> >.

CAMPUS, F. et al. Thrombopoietin complements G(i)- but not G(q)-dependent pathways for integrin {alpha}{IIb}{beta}{3} activation and platelet aggregation. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 24386-95, Jul 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863506> >.

CARLSSON, L. E. et al. **Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GpIIb/IIIa), von Willebrand Factor (GpIb/IX), and collagen (GpIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke.** *Stroke*. 28: 1392-1395 p. 1997.

CERLETTI, C.; DE GAETANO, G.; LORENZET, R. Platelet - leukocyte interactions: multiple links between inflammation, blood coagulation and vascular risk. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. e2010023, 2010. ISSN 2035-3006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415976> >.

CHEN, K. C. et al. Negative feedback regulation between microRNA let-7g and the oxLDL receptor LOX-1. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 23, p. 4115-24, Dec 2011. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22135361> >.

CHEN, L. J. et al. **Role of microRNAs in atherosclerosis and restenosis.** *Journal of Biomedical Sciences*. 19 2012.

CHONCHOL, M.; NIELSON, C. Hemoglobin levels and coronary artery disease. **Am Heart J**, v. 155, n. 3, p. 494-8, Mar 2008. ISSN 1097-6744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18294483> >.

CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. et al. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. **J Clin Invest**, v. 115, n. 3, p. 680-7, Mar 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696195> >.

CUI, X. et al. Simple regression for correcting Δ Ct bias in RT-qPCR low-density array data normalization. **BMC Genomics**, v. 16, p. 82, 2015. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25888492> >.

DA LUZ, P. L. et al. High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 63, n. 4, p. 427-32, Aug 2008. ISSN 1807-5932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719750> >.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **J Biochem**, v. 148, n. 4, p. 381-92, Oct 2010. ISSN 1756-2651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833630> >.

DIEHL, P. et al. Clopidogrel affects leukocyte dependent platelet aggregation by P2Y12 expressing leukocytes. **Basic Res Cardiol**, v. 105, n. 3, p. 379-87, May 2010. ISSN 1435-1803. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943165> >.

DOBIÁSOVÁ, M.; FROHLICH, J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). **Clin Biochem**, v. 34, n. 7, p. 583-8, Oct 2001. ISSN 0009-9120. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738396> >.

DREPPER, M. D.; SPAHR, L.; FROSSARD, J. L. Clopidogrel and proton pump inhibitors--where do we stand in 2012? **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 18, p. 2161-71, May 2012. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22611308> >.

DUFFY, D. et al. Aspirin for cardioprotection and strategies to improve patient adherence. **Postgrad Med**, v. 126, n. 1, p. 18-28, Jan 2014. ISSN 1941-9260. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24393748> >.

DURANTE-MANGONI, E. et al. Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIA gene PLA2 polymorphism. **Thromb Haemost**, v. 80, n. 2, p. 218-9, Aug 1998. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716140> >.

ELSENBERG, E. H. et al. The influence of clinical characteristics, laboratory and inflammatory markers on 'high on-treatment platelet reactivity' as measured with

different platelet function tests. **Thromb Haemost**, v. 102, n. 4, p. 719-27, Oct 2009. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19806258> >.

FARADAY, N. et al. Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. **Am J Cardiol**, v. 98, n. 6, p. 774-9, Sep 2006. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950183> >.

_____. Heritability of platelet responsiveness to aspirin in activation pathways directly and indirectly related to cyclooxygenase-1. **Circulation**, v. 115, n. 19, p. 2490-6, May 2007. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470694> >.

FEHER, G. et al. Aspirin resistance: possible roles of cardiovascular risk factors, previous disease history, concomitant medications and haemorrhological variables. **Drugs Aging**, v. 23, n. 7, p. 559-67, 2006. ISSN 1170-229X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930084> >.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 2, p. 102-14, Feb 2008. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18197166> >.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 2-3, p. 126-39, 2006 Apr-Jun 2006. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469371> >.

FONTANA, P. et al. Antiplatelet Therapy: Targeting the TxA2 Pathway. **J Cardiovasc Transl Res**, Dec 2013. ISSN 1937-5395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24353037> >.

FREEDMAN, J. E. et al. The distribution of circulating microRNA and their relation to coronary disease. **F1000Res**, v. 1, 2012. ISSN 2046-1402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24358814> >.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4337382> >.

GACHET, C. P2Y(12) receptors in platelets and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 3, p. 609-19, Sep 2012. ISSN 1573-9546. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528678> >.

GARABEDIAN, T.; ALAM, S. High residual platelet reactivity on clopidogrel: its significance and therapeutic challenges overcoming clopidogrel resistance.

Cardiovasc Diagn Ther, v. 3, n. 1, p. 23-37, Mar 2013. ISSN 2223-3652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24282742> >.

Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization (WHO) 2011.

GLUBB, D. M.; INNOCENTI, F. Mechanisms of genetic regulation in gene expression: examples from drug metabolizing enzymes and transporters. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 3, n. 3, p. 299-313, 2011 May-Jun 2011. ISSN 1939-005X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20865777> >.

GO, A. S. et al. Hemoglobin level, chronic kidney disease, and the risks of death and hospitalization in adults with chronic heart failure: the Anemia in Chronic Heart Failure: Outcomes and Resource Utilization (ANCHOR) Study. **Circulation**, v. 113, n. 23, p. 2713-23, Jun 2006. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16754803> >.

GOGGS, R. et al. RhoG protein regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice. **J Biol Chem**, v. 288, n. 47, p. 34217-29, Nov 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24106270> >.

_____. Platelet Rho GTPases-a focus on novel players, roles and relationships. **Biochem J**, v. 466, n. 3, p. 431-42, Mar 2015. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25748676> >.

GOODMAN, T.; FERRO, A.; SHARMA, P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. **Br J Clin Pharmacol**, v. 66, n. 2, p. 222-32, Aug 2008. ISSN 1365-2125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429969> >.

GRAMMER, T. B. et al. Hemoglobin, iron metabolism and angiographic coronary artery disease (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study). **Atherosclerosis**, v. 236, n. 2, p. 292-300, Oct 2014. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25112800> >.

GRAU, A. J. et al. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. **Stroke**, v. 35, n. 5, p. 1147-52, May 2004. ISSN 1524-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15017013> >.

GREMMEL, T. et al. Differential impact of inflammation on six laboratory assays measuring residual arachidonic acid-inducible platelet reactivity during dual antiplatelet therapy. **J Atheroscler Thromb**, v. 20, n. 7, p. 630-45, Jul 2013. ISSN 1880-3873. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23739624> >.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. Database issue, p. D154-8, Jan 2008. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991681> >.

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835-40, Aug 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703300> >.

HECHLER, B. et al. A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. **J Exp Med**, v. 198, n. 4, p. 661-7, Aug 2003. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913094> >.

HERS, I. Insulin-like growth factor-1 potentiates platelet activation via the IRS/PI3K pathway. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4243-52, Dec 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827393> >.

HOCHHOLZER, W. et al. Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. **J Am Coll Cardiol**, v. 55, n. 22, p. 2427-34, Jun 2010. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510210> >.

HUANG, X. et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 14, p. 319, 2013. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23663360> >.

IBRAHIM, O. et al. Aspirin resistance in patients with acute coronary events: risk factors and prevalence as determined by whole blood multiple electrode aggregometry. **Pak J Med Sci**, v. 29, n. 6, p. 1319-22, Nov 2013. ISSN 1682-024X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550945> >.

ILLUMINA. **Illumina Sequencing Technology**. 2010. Disponível em: < http://res.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf >. Acesso em: 04 de fevereiro de 2014.

JAKUBOWSKI, J. A. et al. A multiple dose study of prasugrel (CS-747), a novel thienopyridine P2Y₁₂ inhibitor, compared with clopidogrel in healthy humans. **Br J Clin Pharmacol**, v. 63, n. 4, p. 421-30, Apr 2007. ISSN 0306-5251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17076696> >.

JASTRZĘBSKA, M. et al. Factors influencing multiplate whole blood impedance platelet aggregometry measurements, during aspirin treatment in acute ischemic stroke: a pilot study. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 24, n. 8, p. 830-8, Dec 2013. ISSN 1473-5733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24071649> >.

JENNINGS, L. K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. **Thromb Haemost**, v. 102, n. 2, p. 248-57, Aug 2009. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19652875> >.

JUNG, K. H. et al. Prolonged use of aspirin alters human and rat intestinal cells and thereby limits the absorption of clopidogrel. **Clin Pharmacol Ther**, v. 90, n. 4, p. 612-9, Oct 2011. ISSN 1532-6535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900887> >.

KAPLAN, Z. S.; JACKSON, S. P. The role of platelets in atherothrombosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2011, p. 51-61, 2011. ISSN 1520-4383. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160012> >.

KAREPOV, V. et al. Plasma triglycerides as predictors of platelet responsiveness to aspirin in patients after first ischemic stroke. **Cerebrovasc Dis**, v. 26, n. 3, p. 272-6, 2008. ISSN 1421-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18648200> >.

KAZES, I. et al. Platelet release of trimolecular complex components MT1-MMP/TIMP2/MMP2: involvement in MMP2 activation and platelet aggregation. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3064-9, Nov 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049985> >.

KELLER, A. et al. Toward the blood-borne miRNome of human diseases. **Nat Methods**, v. 8, n. 10, p. 841-3, 2011. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892151> >.

KIM, H. et al. Prevalence and risk factors for aspirin and clopidogrel resistance in patients with coronary artery disease or ischemic cerebrovascular disease. **Ann Clin Lab Sci**, v. 39, n. 3, p. 289-94, 2009. ISSN 1550-8080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19667414> >.

KIM, S. et al. Insulin-like growth factor-1 regulates platelet activation through PI3-Kalpa isoform. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4206-13, Dec 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827385> >.

KIM, V. N.; NAM, J. W. Genomics of microRNA. **Trends Genet**, v. 22, n. 3, p. 165-73, Mar 2006. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446010> >.

KOFOED, S. C. et al. Fibrinogen predicts ischaemic stroke and advanced atherosclerosis but not echolucent, rupture-prone carotid plaques: the Copenhagen City Heart Study. **Eur Heart J**, v. 24, n. 6, p. 567-76, Mar 2003. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12643890> >.

KONDKAR, A. A. et al. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. **J Thromb Haemost**, v. 8, n. 2, p. 369-78, Feb 2010. ISSN 1538-7836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943878> >.

KUMAR, A.; CANNON, C. P. Acute coronary syndromes: Diagnosis and management, part II. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 11, p. 1021-36, Nov 2009. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880693> >.

KVILEKVAL, K. et al. Fatty acids as determinants of triglyceride and cholesteryl ester synthesis by isolated hepatocytes: kinetics as a function of various fatty acids. **J Lipid Res**, v. 35, n. 10, p. 1786-94, Oct 1994. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7852855> >.

LAGERCRANTZ, J. et al. No evidence that the PLA1/PLA2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is implicated in angiographically characterized coronary atherosclerosis and premature myocardial infarction. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 14, n. 8, p. 749-53, Dec 2003. ISSN 0957-5235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614355> >.

LANDRY, P. et al. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. **Nat Struct Mol Biol**, v. 16, n. 9, p. 961-6, Sep 2009. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19668211> >.

LAU, N. C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 858-62, Oct 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679671> >.

LEE, C. W. Dual antiplatelet therapy for coronary artery disease. **Circ J**, v. 79, n. 2, p. 255-62, 2015. ISSN 1347-4820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25744739> >.

LEE, P. Y. et al. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. **Am J Med**, v. 118, n. 7, p. 723-7, Jul 2005. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989905> >.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621> >.

LEV, E. I. et al. Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the role of dual drug resistance. **J Am Coll Cardiol**, v. 47, n. 1, p. 27-33, Jan 2006. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386660> >.

LI, J. et al. Neutrophil AKT2 regulates heterotypic cell-cell interactions during vascular inflammation. **J Clin Invest**, v. 124, n. 4, p. 1483-96, Apr 2014. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24642468> >.

_____. Circulating microRNAs as mirrors of acute coronary syndromes: MiRacle or quagMire? **J Cell Mol Med**, v. 17, n. 11, p. 1363-70, Nov 2013. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188699> >.

LI, Z. et al. Two waves of platelet secretion induced by thromboxane A2 receptor and a critical role for phosphoinositide 3-kinases. **J Biol Chem**, v. 278, n. 33, p. 30725-31, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796499> >.

_____. An important role of the SRC family kinase Lyn in stimulating platelet granule secretion. **J Biol Chem**, v. 285, n. 17, p. 12559-70, Apr 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189992> >.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516281> >.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834-8, Jun 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944708> >.

LUCHESSI, A. D. et al. Increased clopidogrel response is associated with ABCC3 expression: a pilot study. **Clin Chim Acta**, v. 413, n. 3-4, p. 417-21, Feb 2012. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22040781> >.

LUDEMAN, M. J. et al. PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. **J Biol Chem**, v. 280, n. 13, p. 13122-8, Apr 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15665002> >.

MARCZEWSKI, M. M.; POSTULA, M.; KOSIOR, D. Novel antiplatelet agents in the prevention of cardiovascular complications--focus on ticagrelor. **Vasc Health Risk Manag**, v. 6, p. 419-29, 2010. ISSN 1178-2048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539844> >.

MARENBERG, M. E. et al. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. **N Engl J Med**, v. 330, n. 15, p. 1041-6, Apr 1994. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8127331> >.

MARESCA, G. et al. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 6, p. 1368-77, Jun 1999. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364066> >.

MARGUERIE, G. A. et al. The platelet-fibrinogen interaction. Evidence for proximity of the A alpha chain of fibrinogen to platelet membrane glycoproteins IIb/III. **Eur J Biochem**, v. 139, n. 1, p. 5-11, Feb 1984. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6230229> >.

MATETZKY, S. et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 109, n. 25, p. 3171-5, Jun 2004. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15184279> >.

MATTOS, L. A. et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia – Intervenção Coronária Percutânea e Métodos Adjuntos. Diagnósticos em Cardiologia Intervencionista (II Edição – 2008). **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 16, n. 2, 2008. Disponível em: < http://www.rbc.org.br/imageBank/PDF/RBCI_Diretrizes_16-2.pdf >.

MEHTA, J. L.; SALDEEN, T. G.; RAND, K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 31, n. 6, p. 1217-25, May 1998. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9581711> >.

MENDELL, J. T.; OLSON, E. N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1172-87, Mar 2012. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424228> >.

MESTDAGH, P. et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. **Nat Methods**, v. 11, n. 8, p. 809-15, Aug 2014. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973947> >.

METPALLY, R. P. et al. Comparison of Analysis Tools for miRNA High Throughput Sequencing Using Nerve Crush as a Model. **Front Genet**, v. 4, p. 20, 2013. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23459507> >.

MEYER, S. U. et al. Profound effect of profiling platform and normalization strategy on detection of differentially expressed microRNAs--a comparative study. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38946, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22723911> >.

MORIYAMA, T. et al. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. **Mol Cancer Ther**, v. 8, n. 5, p. 1067-74, May 2009. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19435867> >.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 8, p. 1894-904, Aug 2005. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102057> >.

MUIR, A. R. et al. Assessment of aspirin resistance varies on a temporal basis in patients with ischaemic heart disease. **Heart**, v. 95, n. 15, p. 1225-9, Aug 2009. ISSN 1468-201X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18697805> >.

MÜLLER, C. New ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. **Swiss Med Wkly**, v. 142, p. w13514, 2012. ISSN 1424-3997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22441979> >.

MÜLLER, D. W.; BOSSERHOFF, A. K. Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. **Oncogene**, v. 27, n. 52, p. 6698-706, Nov 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18679415> >.

NARVAEZ, I. et al. Prevalence and biologic profile of aspirin resistance in patients with angiographically proven coronary artery disease. **Thromb Res**, v. 120, n. 5, p. 671-7, 2007. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331566> >.

NATARAJAN, P.; RAY, K. K.; CANNON, C. P. High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. **J Am Coll Cardiol**, v. 55, n. 13, p. 1283-99, Mar 2010. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338488> >.

NEUBAUER, H. et al. Tailored antiplatelet therapy can overcome clopidogrel and aspirin resistance--the BOchum CLOpidogrel and Aspirin Plan (BOCLA-Plan) to improve antiplatelet therapy. **BMC Med**, v. 9, p. 3, 2011. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21226927> >.

NICOLAU, J. C. et al. **Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST** 89: e89-e131 p. 2007.

NORGARD, N. B.; ABU-FADEL, M. Comparison of prasugrel and clopidogrel in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention. **Vasc Health Risk Manag**, v. 5, p. 873-82, 2009. ISSN 1178-2048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898643> >.

O'KEEFE, J. H.; CARTER, M. D.; LAVIE, C. J. Primary and secondary prevention of cardiovascular diseases: a practical evidence-based approach. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 8, p. 741-57, Aug 2009. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19648392> >.

OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. **J Cell Physiol**, v. 222, n. 3, p. 540-5, Mar 2010. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020507> >.

OTA, A. et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. **Cancer Res**, v. 64, n. 9, p. 3087-95, May 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126345> >.

PAN, Y. Z.; GAO, W.; YU, A. M. MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. **Drug Metab Dispos**, v. 37, n. 10, p. 2112-7, Oct 2009. ISSN 1521-009X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581388> >.

PAN, Y. Z.; MORRIS, M. E.; YU, A. M. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. **Mol Pharmacol**, v. 75, n. 6, p. 1374-9, Jun 2009. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270061> >.

PARODI, G. et al. High residual platelet reactivity after clopidogrel loading and long-term cardiovascular events among patients with acute coronary syndromes undergoing PCI. **JAMA**, v. 306, n. 11, p. 1215-23, Sep 2011. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21934054> >.

PEDREÑO, J. et al. Platelet function in patients with familial hypertriglyceridemia: evidence that platelet reactivity is modulated by apolipoprotein E content of very-low-density lipoprotein particles. **Metabolism**, v. 49, n. 7, p. 942-9, Jul 2000. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910008> >.

PETERS, B. J. et al. Pharmacogenetics of cardiovascular drug therapy. **Clin Cases Miner Bone Metab**, v. 6, n. 1, p. 55-65, Jan 2009. ISSN 1724-8914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461099> >.

PETTERSEN, A. A. et al. The influence of CYP 2C19*2 polymorphism on platelet function testing during single antiplatelet treatment with clopidogrel. **Thromb J**, v. 9, p. 4, 2011. ISSN 1477-9560. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21426546> >.

PIEGAS, L. S. et al. **Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST:** Arquivo Brasileiro de Cardiologia 2009.

PLÉ, H. et al. The repertoire and features of human platelet microRNAs. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50746, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226537> >.

POLANCZYK, C. A.; RIBEIRO, J. P. Coronary artery disease in Brazil: contemporary management and future perspectives. **Heart**, v. 95, n. 11, p. 870-6, Jun 2009. ISSN 1468-201X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261601> >.

PRITCHARD, C. C.; CHENG, H. H.; TEWARI, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 5, p. 358-69, May 2012. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22510765> >.

RESÉNDIZ, J. C.; KROLL, M. H.; LASSILA, R. Protease-activated receptor-induced Akt activation--regulation and possible function. **J Thromb Haemost**, v. 5, n. 12, p. 2484-93, Dec 2007. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17883592> >.

RIDDELL, D. R.; GRAHAM, A.; OWEN, J. S. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine:nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. **J Biol Chem**, v. 272, n. 1, p. 89-95, Jan 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995232> >.

RODRIGUES, A. C. et al. MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines. **Biopharm Drug Dispos**, v. 32, n. 6, p. 355-67, Sep 2011. ISSN 1099-081X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796641> >.

ROSADO, J. A. et al. Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function. **J Cell Physiol**, v. 209, n. 1, p. 142-52, Oct 2006. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791842> >.

RUKOV, J. L. et al. Pharmaco-miR: linking microRNAs and drug effects. **Brief Bioinform**, v. 15, n. 4, p. 648-59, Jul 2014. ISSN 1477-4054. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376192> >.

SABATINE, M. S. et al. Association of hemoglobin levels with clinical outcomes in acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 111, n. 16, p. 2042-9, Apr 2005. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824203> >.

SAHIN, D. Y. et al. [The frequency of aspirin resistance by a modified thrombelastography method and its relationship with clinical and laboratory parameters in patients with stable coronary artery disease]. **Turk Kardiyol Dern Ars**, v. 40, n. 1, p. 33-40, Jan 2012. ISSN 1016-5169. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22395372> >.

SAMPAIO, M. F. et al. AMI is associated with polymorphisms in the NOS3 and FGB but not in PAI-1 genes in young adults. **Clin Chim Acta**, v. 377, n. 1-2, p. 154-62, Feb 2007. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126309> >.

SCHÖLER, N. et al. Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. **Exp Hematol**, v. 38, n. 12, p. 1126-30, Dec 2010. ISSN 1873-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20977925> >.

SCHÖLER, N.; LANGER, C.; KUCHENBAUER, F. Circulating microRNAs as biomarkers - True Blood? **Genome Med**, v. 3, n. 11, p. 72, 2011. ISSN 1756-994X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112937> >.

SELBACH, M. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 58-63, Sep 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668040> >.

SELHEIM, F.; HOLMSEN, H.; VASSBOTN, F. S. Identification of functional VEGF receptors on human platelets. **FEBS Lett**, v. 512, n. 1-3, p. 107-10, Feb 2002. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11852061> >.

SHAH, A. D. et al. Threshold haemoglobin levels and the prognosis of stable coronary disease: two new cohorts and a systematic review and meta-analysis. **PLoS Med**, v. 8, n. 5, p. e1000439, May 2011. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655315> >.

SHCHERBINA, A.; REMOLD-O'DONNELL, E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4222-31, Jun 1999. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361119> >.

SHULDINER, A. R. et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. **JAMA**, v. 302, n. 8, p. 849-57, Aug 2009. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706858> >.

SIDDIQUI, T. I.; KUMAR, K. S.; DIKSHIT, D. K. Platelets and atherothrombosis: causes, targets and treatments for thrombosis. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 22, p. 2779-97, 2013. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23590713> >.

SINHA, A. K. et al. Inhibition of thromboxane A2 synthesis in human platelets by coagulation factor Xa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 19, p. 6086-90, Oct 1983. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6577468> >.

STEG, P. G. et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. **Eur Heart J**, v. 33, n. 20, p. 2569-619, Oct 2012. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922416> >.

STREIFLER, J. Y. et al. Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1 (Leu33Pro) polymorphism. **Stroke**, v. 32, n. 12, p. 2753-8, Dec 2001. ISSN 1524-4628. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739968> >.

TAKAGI, S. et al. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. **J Biol Chem**, v. 283, n. 15, p. 9674-80, Apr 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18268015> >.

TAN, G. W.; KHOO, A. S.; TAN, L. P. Evaluation of extraction kits and RT-qPCR systems adapted to high-throughput platform for circulating miRNAs. **Sci Rep**, v. 5, p. 9430, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25800946> >.

TANAKA, N. et al. Constitutive expression and involvement of cyclooxygenase-2 in human megakaryocytopoiesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 3, p. 607-12, Mar 2004. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726416> >.

TEICH, V.; ARAÚJO, D. V. Estimativa de custo da síndrome coronariana aguda no Brasil. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 24, n. 2, p. 85-94, 2011.

TOLMACHOVA, T. et al. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 14, p. 5872-7, Apr 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384153> >.

TSANG, W. P.; KWOK, T. T. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. **Apoptosis**, v. 13, n. 10, p. 1215-22, Oct 2008. ISSN 1573-675X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758960> >.

UNDAS, A.; BRUMMEL-ZIEDINS, K. E.; MANN, K. G. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2285-92, Mar 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148593> >.

UZUN, F. et al. Antiplatelet resistance and the role of associated variables in stable patients treated with stenting. **Postepy Kardiol Interwencyjnej**, v. 11, n. 1, p. 19-25, 2015. ISSN 1734-9338. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848366> >.

VARENHORST, C. et al. Duration of dual antiplatelet treatment with clopidogrel and aspirin in patients with acute coronary syndrome. **Eur Heart J**, Oct 2013. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122961> >.

WAGNER, D. D.; FRENETTE, P. S. The vessel wall and its interactions. **Blood**, v. 111, n. 11, p. 5271-81, Jun 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502843> >.

WAN, K. et al. The association between triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio and all-cause mortality in acute coronary syndrome after coronary revascularization. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123521, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25880982> >.

WEBER, A. A. et al. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. **Lancet**, v. 353, n. 9156, p. 900, Mar 1999. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10093990> >.

WHO. **Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Geneva: WHO: 1-153 p. 2011.

_____. **The top 10 causes of death**. World Health Organization. 2013

_____. **Global Status Report on Noncommunicable Diseases**. World Health Organization. 2014

WILLEIT, P. et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. **Circ Res**, v. 112, n. 4, p. 595-600, Feb 2013. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283721> >.

WILLIAMS, R. R. et al. Usefulness of cardiovascular family history data for population-based preventive medicine and medical research (the Health Family Tree Study and the NHLBI Family Heart Study). **Am J Cardiol**, v. 87, n. 2, p. 129-35, Jan 2001. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152826> >.

WOULFE, D. et al. Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. **J Clin Invest**, v. 113, n. 3, p. 441-50, Feb 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14755341> >.

XAVIER, H. T. et al. [V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 4 Suppl 1, p. 1-20, Oct 2013. ISSN 1678-4170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217493> >.

YALCINKAYA, E.; CELIK, M. Evaluation of inflammatory conditions associated with aspirin resistance. **Ups J Med Sci**, v. 119, n. 3, p. 292-3, Aug 2014. ISSN 2000-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24835796> >.

YE, F.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. Reconstruction of integrin activation. **Blood**, v. 119, n. 1, p. 26-33, Jan 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921044> >.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil interactions: linking hemostasis and inflammation. **Blood Rev**, v. 21, n. 2, p. 99-111, Mar 2007. ISSN 0268-960X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16987572> >.

ZHANG, G. et al. Distinct roles for Rap1b protein in platelet secretion and integrin α IIb β 3 outside-in signaling. **J Biol Chem**, v. 286, n. 45, p. 39466-77, Nov 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940635> >.

ZHU, H. et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 5, p. 582-8, Sep 2008. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18619946> >.

ANEXOS



**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/157/2011

Protocolo CEP/FCF/589

CAAE: 0036.0.018.131-11

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Análise Transcriptômica de miRNAs em Pacientes com Dupla Terapia de Antiagregação
Pesquisador Responsável:	Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Aluno(a) envolvido(a):	Juliana de Freitas Germano
Instituição:	FCF-USP
Área Temática Especial:	Genética Humana

II - Sumário Geral do Protocolo:

Antiagregantes plaquetários como o bissulfato de clopidogrel e ácido acetilsalicílico (AAS) podem contribuir para com a evolução desfavorável da síndrome coronariana em pacientes submetidos à angioplastia coronária. Micro RNAs (miRNA) são capazes de regular a expressão gênica. Pretende-se avaliar a expressão de miRNAs de 340 pacientes com indicação de revascularização percutânea com angioplastia coronária e implante de "stent", verificando-se a ocorrência ou não de uma correlação entre essa expressão e as diferentes respostas aos medicamentos em tela.

Os objetivos do presente estudo são:

Geral: Avaliar a relação entre a variabilidade na resposta antiagregante com a expressão diferencial de miRNA e polimorfismos presentes nos miRNAs.

Específicos:

1. Avaliar a resposta ao tratamento com os antiagregantes clopidogrel e AAS utilizando o sistema *Multiple Dynabyte* através da medida qualitativa da resposta inibição da agregação plaquetária;
2. Determinar a expressão gênica global de miRNAs envolvidos através do sistema *GeneChip miRNA array*;
3. Estudar a relação existente entre os principais polimorfismos presentes nos miRNAs envolvidos na síndrome coronariana e a resposta ao tratamento com clopidogrel e AAS através do sistema de genotipagem PiroMark Q24;
4. Avaliar as correlações entre os três principais fatores envolvidos na farmacogenômica do clopidogrel e do AAS: expressão gênica de miRNAs, presença de SNP e inibição da agregação plaquetária.

Tipo de estudo: Transversal.

Descrição da Casuística:

Serão selecionados 340 pacientes dos dois sexos e com idades entre 30 e 80 anos, apresentando: 1. Sintomas ou sinais de isquemia do miocárdio, com lesões ateromatosas graves (> 75% por estimativa visual ou >50% por avaliação angiográfica automática quantitativa); 2. Dose de ataque de 600 mg de clopidogrel e 300 mg de AAS nas 24 horas anteriores ao procedimento de angioplastia coronária ou dose de ataque de 300 mg de clopidogrel com dose de manutenção de 100 mg de AAS diárias.

Da veia antecubital e com sistema a vácuo será retirado um total aproximado de 30 mL (ver TCLE) de sangue, por meio de uma única punção.



Pretende-se realizar os seguintes exames nesse material biológico: 1. Determinação de fibrinogênio; 2. Avaliação da agregação plaquetária; 3. Extração de RNA e DNA; 4. Dosagens bioquímicas (glicose; colesterol total e frações; uréia; creatinina; ácido úrico; proteína C reativa (PCR) ultrasensível) e enzimáticas (aspartato e alanina aminotransferases); 5. Leucograma, hemograma e contagem de plaquetas.

Será aplicado um questionário para obtenção de dados como nome do paciente etc, seu hábitos de vida (se tabagista, etilista; sua profissão, se pratica exercícios, peso e altura, se diabético, hipertenso, dislipidêmico, se tem insuficiência renal e dados relativos ao tratamento anterior com AAS, clopidogrel e outros).

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 29/08/2011.

Cabe ao pesquisador responsável:

- Comunicar ao CEP:
 - A ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido termo. Da mesma forma, o sujeito de pesquisa ou seu representante legal.
- Apresentar relatório parcial em dez/2013 e relatório final em dez/2015. (modelo do CEP)

São Paulo, 17 de outubro de 2011.

Prof. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP



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



DATA DA ENTRADA: 13 de setembro de 2011.

DATA DA 1ª AVALIAÇÃO: 04 de outubro de 2011.

DATA DA AVALIAÇÃO FINAL: 07 de outubro de 2011.

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4150

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

Investigador Principal: Prof. Mario Hiroyuki Hirata

Nº de Sujeitos no Centro: 340

Nº de Sujeitos no Brasil: 340

Nº de Sujeitos Total: 340

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas - Genéticas

Área Temática Especial: Genética Humana

Unitermos: miRNA, agregação, transcriptoma

Fase: Não se aplica

Nível: Não informado

Duração do Estudo: 04 anos

Patrocinador: Não se aplica

Grupo: II

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Instituição Co-Participante: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

CEP: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Projeto de Pesquisa Clínica: "Análise Transcriptômica de miRNAs em Pacientes com Dupla Terapia de Antiagregação".

Considerações/Comentários: Este estudo tem por objetivo avaliar a relação entre a variabilidade na resposta antiagregante com a expressão diferencial de miRNA e polimorfismos presentes nos miRNA.



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



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

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

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

- Protocolo de Pesquisa Clínica – Aprovado
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado
- Cronograma do Estudo – Entregue
- Orçamento Financeiro Detalhado – Entregue
- Parecer de Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa/CEP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Entregue
- Declaração de Anuência/ IDPC – Dra. Amanda GMR Sousa/ Dr. Luiz Fernando Tanajura – Entregue
- Declaração de Anuência/ USP – Dra. Marina Martinez/ Profa. Rosário Hirata – Entregue
- Folha de Rosto – Entregue



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



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.

“Declaro ter lido e concordar com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição proponente, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

São Paulo, 04 de outubro de 2011.

Pedro S. Farsky

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 56073

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



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



MEMBROS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – Mandato 2010 – 2013

Pedro Silvio Farsky	Médico/ Coordenador/ Presidente
Abílio Augusto Fragata Filho	Médico/ Vice-Coordenador
Antonio Flavio Sanches de Almeida	Médico/ Membro
Carolina de Campos Gonzaga	Médica/ Membro
Célia Hiromi Shiotsu	Enfermeira/ Membro
Cristiane Kovascks	Nutricionista/ Membro
Daniel Fomariz Legendre	Engenheiro/ Membro
Gustavo Bernardes de Figueiredo Oliveira	Médico/ Membro
José de Ribamar Costa Junior	Médico/ Membro
Juliana Ribeiro Bruscano	Farmacêutica-Bioquímica/ Membro
Marco Aurélio Finger	Médico/ Membro
Otílio Geraldo Bastlio (Representante do Usuário)	Presidente da Associação dos Transplantados Cardíacos – ATC - do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia/ Membro
Paola Emanuela Poggio Smanio	Médica/ Membro
Paula Lima	Bióloga/ Membro
Rika Miyahara Kobayashi	Enfermeira/ Membro
Raquel Oliveira Lima Lascane	Advogada/ Membro
Rudy Antonio Mildner	Sacerdote da Congregação do Sagrado Coração de Jesus/ Membro
Sônia Lima Medeiros	Assistente Social/ Membro



Juliana de Freitas Germano

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2613533607753793>

Última atualização do currículo em 01/12/2015

Bolsista de Doutorado do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob orientação do Professor Titular Mario H. Hirata. Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Estadual de Londrina (2005). Pós-graduada em Análises Clínicas pela Universidade Estadual de Londrina (2007). Atuou como Biologista e Supervisora do Laboratório de Controle de Qualidade para a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FUNDHERP - USP) no período de 2007 a 2010 e como Farmacêutica Supervisora do Laboratório de Urgência do Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual (IAMSPE) de 2010 a 2012. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Juliana de Freitas Germano 

Nome em citações bibliográficas GERMANO, J. F.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em andamento em Biologia Molecular. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
com **período sanduíche** em Universidad de Santiago de Compostela - Campus Santiago (Orientador: Angel Maria Carracedo Alvarez).
Título: Análise Transcriptômica de miRNAs em Pacientes com Dupla Terapia de Antiagregação,
Orientador:  Mario Hiroyuki Hirata.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Palavras-chave: miRNAs; sequenciamento de última geração; AAS; clopidogrel; Síndrome Coronariana Aguda.
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO DIAGNÓSTICO.
- 2006 - 2007** Especialização em Análises Clínicas. (Carga Horária: 360h). Universidade Estadual de Londrina, UEL, Brasil.
Título: Leucemia Linfóide Aguda na Infância: Diagnóstico e Tratamento.
Orientador: Aparecida de Lourdes Perim.
- 2001 - 2005** Graduação em Farmácia e Bioquímica. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Brasil.
Título: CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇA HIPERTENSIVA RELACIONADA COM O CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA EM MORADORES DA REGIÃO SUL DA CIDADE DE LONDRINA.
Orientador: CLAUDETE FAIAD NAME.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Formação Complementar

2011 - 2011	Aprimoramento. (Carga horária: 400h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2010 - 2011	Aprimoramento. (Carga horária: 400h). Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, IDPC, Brasil.
2006 - 2006	Estágio em laboratório clínico. (Carga horária: 88h). Hospital Geral de Promissão, HGP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2014	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6
--------------------	---

Outras informações

Fisiopatologia Integrado III

Atividades

02/2012 - Atual	Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, . Linhas de pesquisa Pesquisa de miRNAs envolvidos na falha de resposta a antiagregantes plaquetários em pacientes com Doença Arterial Coronariana
------------------------	--

Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual, IAMSPE, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2012	Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Farmacêutica - Serviço de Laboratório Clínico, Carga horária: 30
--------------------	--

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, FUNDHERP, Brasil.

Vínculo institucional

2007 - 2010	Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Biologista, Carga horária: 40
--------------------	---

Linhas de pesquisa

1.	Pesquisa de miRNAs envolvidos na falha de resposta a antiagregantes plaquetários em pacientes com Doença Arterial Coronariana
-----------	---

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Alemão	Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados

1.  Hirata, M.H. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, T. D. C. ; WANG, H. T. L. ; SILVA, J. L. ; **GERMANO, J. F.** . Métodos de Biologia Molecular Aplicados à Cardiologia. In: Mario Hiroyuki Hirata; Rosario Dominguez Crespo Hirata; Amanda G. M. R. Sousa. (Org.). Ciências da Saúde no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Biologia Molecular. 1ed.São

Paulo: Atheneu, 2013, v. 1, p. 106-167.

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ HIRATA, M. H. ; CAVICHIOLI, D. ; **GERMANO, J. F.** ; BRAGA, A. A. ; CERDA, A. ; FAJARDO, C. ; SAMPAIO, M. F. ; SANTOS, E. S. ; MENUSSO, L. ; SOUSA, A. G. M. R. ; HIRATA, R. D. . ACUTE CORONARY SYNDROME AND GENE POLYMORPHISMS INFLUENCE LEUKOCYTE mRNA EXPRESSION OF ADHESION MOLECULES AND INFLAMMATORY PROTEINS. In: European Atherosclerosis Society, 2014, Madrid. Atherosclerosis. Amsterdam: Elsevier, 2014. v. 235. p. e41-e41.
2. ★ Luchessi, A.D. ; **GERMANO, J. F.** ; Hirata, M.H. ; HIRATA, R. D. ; Silbiger, V.N. ; Brión, M. ; Carracedo, A. ; TANAJURA, L. F. L. ; SAMPAIO, M. F. ; LIMA, P. H. O. ; HIRATA, T. D. C. ; SOUSA, A. G. M. R. . Relationship of CYP2C9, CYP2C19 and ABCC3 polymorphisms and platelet response to aspirin and clopidogrel in acute coronary syndrome patients. In: 6th Santorini Conference Biologie Prospective 2012, 2012, Santorini. Drug Metabolism and Drug Interactions, 2012. v. 27. p. A28-A28.

Apresentações de Trabalho

1. ★ **GERMANO, J. F.** ; LEITE, G. G. ; MAUREIRA, A. C. ; NAKAYA, H. T. ; FERREIRA, F. M. ; RAMOS, R. ; HIARATA, T. D. C. ; SOUSA, A. G. M. ; Luchessi, A.D. ; HIRATA, R. D. ; Hirata, M.H. . Differentially expressed miRNAs are potential biomarkers for poor response to dual antiplatelet therapy in patients with coronary arterial disease. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. BASTOS, G. M. ; SOUZA, D. D. ; **GERMANO, J. F.** ; SILDARRIAGA, M. E. G. ; MORI, A. A. ; FAJARDO, C. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . Hypertrophic cardiomyopathy: novel variants in MYH7, MYBPC3 and TNNT2.. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. WANG, H. T. L. ; ARAUJO, N. N. F. ; **GERMANO, J. F.** ; FARSKY, P. S. ; FELDMAN, A. ; BASTOS, G. M. ; HIRATA, M. H. ; BERTOLAMI, M. C. . Imbalance between expression of miRNAs that regulate matrix metalloproteinases and tissue inhibitor are involved in abdominal aortic aneurysm pathogenesis. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. ★ **GERMANO, J. F.** ; Luchessi, A.D. ; HIRATA, R. D. C. ; Silbiger, V.N. ; Brión, M. ; Carracedo, A. ; TANAJURA, L. F. L. ; Sampaio, M.F. ; LIMA, P. H. O. ; HIRATA, T. D. C. ; SOUSA, A. G. M. R. ; Hirata, M.H. . Antiaggregation response to aspirin and clopidogrel can be differentiated by polymorphisms in P2RY1, TBXAS1, PTGS1 and ITGB3.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
5. **GERMANO, J. F.** ; Rissi, N.M.N. ; Domingues, P.R. ; Oliveira, P.E.C. ; Sato, H. ; Name, C.F. . CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇA HIPERTENSIVA RELACIONADA COM CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA EM MORADORES DA REGIÃO SUL DA CIDADE DE LONDRINA-PR. 2002. (Apresentação de Trabalho/Outra).
6. **GERMANO, J. F.** ; Rissi, N.M.N. ; Domingues, P.R. ; Oliveira, P.E.C. ; MOREIRA, E.G. ; Sato, H. ; Name, C.F. . ALCOOLISMO E HISTÓRIA FAMILIAR DE ALCOOLISMO: FATORES DE RISCO EM BAIROS DA ZONA SUL DO MUNICÍPIO DE LONDRINA-PR. 2002. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. **GERMANO, J. F.** ; Rissi, N.M.N. ; Domingues, P.R. ; Oliveira, P.E.C. ; Sato, H. ; Name, C.F. . PREVALÊNCIA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL EM ASSENTADOS DA ZONA SUL DO MUNICÍPIO DE LONDRINA-PR. 2002. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Demais tipos de produção técnica

1. **GERMANO, J. F.** ; MAUREIRA, A. C. ; LEITE, G. G. S. ; BASTOS, G. M. ; HIRATA, T. D. C. ; FAJARDO, C. . Ultrassequenciamento: Técnicas, Aplicações e Análise de Dados. 2014. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. AACC Personalized Diagnostics Today. 2014. (Encontro).
2. AACC Personalized Diagnostics Today. Differentially expressed miRNAs are associated with poor response to dual antiplatelet therapy in patients with acute coronary syndrome.. 2014. (Outra).
3. Nucleic Acids Conference - Zing Conferences. Antiaggregation response to aspirin and clopidogrel can be differentiated by polymorphisms in P2RY1, TBXAS1, PTGS1 and ITGB3.. 2012. (Congresso).
4. 6th Santorini Conference Biologie Prospective. Relationship of CYP2C9, CYP2C19 and ABCB3 polymorphisms and platelet response to aspirin and clopidogrel in acute coronary syndrome patients.. 2012. (Congresso).
5. EMBO Meeting. 2012. (Encontro).
6. IX Simpósio de biossegurança e descartes de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa. 2010. (Simpósio).
7. IV Jornada de Imuno-hematologia ? XI Simpósio Internacional de Hemoterapia? realizado no Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês. 2009. (Simpósio).
8. VIII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e II Encontro de Farmácia Industrial. 2005. (Congresso).
9. Curso sobre o Diagnóstico Clínico-Laboratorial das Principais Micoses. 2005. (Outra).
10. CURSO DE INFECÇÃO HOSPITALAR. 2005. (Outra).
11. Seminário sobre Prática Farmacêutica e Formação Profissional. 2003. (Seminário).
12. I Simpósio Integrado dos Bacharelados em Biomedicina e I Mostra de Painéis em Biomedicina. 2003. (Simpósio).
13. Montagem de Farmácia de Manipulação: investimento, equipamentos e instalações. 2003. (Outra).
14. I Congresso Paranaense de Biologia Aplicada à Saúde, V Congresso Londrinense de Biologia Aplicada à Saúde", "II Encontro Paranaense de Biomedicina. Alcoolismo e história familiar de alcoolismo: fatores de risco em bairros da zona sul do município de Londrina.. 2002. (Congresso).
15. I Congresso Paranaense de Biologia Aplicada à Saúde, V Congresso Londrinense de Biologia Aplicada à Saúde, II Encontro Paranaense de Biomedicina. Prevalência de hipertensão arterial em assentados da zona sul do município de Londrina - PR.. 2002. (Congresso).
16. I Encontro de Farmácia Hospitalar de Londrina e Região. 2002. (Encontro).
17. Curso Introdutório ao Seguimento Farmacoterapêutico - Metodologia Dáder. 2002. (Outra).
18. I Mostra Integrada de Projetos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEL. Contribuição para o estudo epidemiológico de doença hipertensiva relacionada com consumo de bebida alcoólica em moradores da região sul da cidade de Londrina.. 2002. (Outra).
19. I Ciclo de Preparação Profissionalizante para o Farmacêutico. 2001. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **GERMANO, J. F.** ; VIII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e II Encontro de Farmácia Industrial. 2005. (Congresso).

Educação e Popularização de C & T

Livros e capítulos

1. ★ Hirata, M.H. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, T. D. C. ; WANG, H. T. L. ; SILVA, J. L. ; **GERMANO, J. F.** . Métodos de Biologia Molecular Aplicados à Cardiologia. In: Mario Hiroyuki Hirata; Rosario Dominguez Crespo Hirata; Amanda G. M. R. Sousa. (Org.). Ciências da Saúde no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Biologia Molecular. 1ed.São Paulo: Atheneu, 2013, v. 1, p. 106-167.

Apresentações de Trabalho

1. ★ **GERMANO, J. F.** ; Luchessi, A.D. ; HIRATA, R. D. C. ; Silbiger, V.N. ; Brión, M. ; Carracedo, A. ; TANAJURA, L. F. L. ; Sampaio, M.F. ; LIMA, P. H. O. ; HIRATA, T. D. C. ; SOUSA, A. G. M. R. ; Hirata, M.H. . Antiaggregation response to aspirin and clopidogrel can be differentiated by polymorphisms in P2RY1, TBXAS1, PTGS1 and ITGB3.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. ★ **GERMANO, J. F.** ; LEITE, G. G. ; MAUREIRA, A. C. ; NAKAYA, H. T. ; FERREIRA, F. M. ; RAMOS, R. ; HIARATA, T. D. C. ; SOUSA, A. G. M. ; Luchessi, A.D. ; HIRATA, R. D. ; Hirata, M.H. . Differentially expressed miRNAs are potential biomarkers for poor response to dual antiplatelet therapy in patients with coronary arterial disease. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. BASTOS, G. M. ; SOUZA, D. D. ; **GERMANO, J. F.** ; SILDARRIAGA, M. E. G. ; MORI, A. A. ; FAJARDO, C. ; HIRATA, R. D. C. ; HIRATA, M. H. . Hypertrophic cardiomyopathy: novel variants in MYH7, MYBPC3 and TNNT2.. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Cursos de curta duração ministrados

1. **GERMANO, J. F.** ; MAUREIRA, A. C. ; LEITE, G. G. S. ; BASTOS, G. M. ; HIRATA, T. D. C. ; FAJARDO, C. . Ultrassequenciamento: Técnicas, Aplicações e Análise de Dados. 2014. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 04/12/2015 às 16:13:03