

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Genética, Ecologia e Evolução

Programa de Pós-Graduação em Genética

Karwhory Wallas Lins da Silva

**FARMACOGENÉTICA DO *CYP2C19* EM PACIENTES USUÁRIOS DO
CLOPIDOGREL: estudo piloto**

Belo Horizonte

2024

Karwhory Wallas Lins da Silva

**FARMACOGENÉTICA DO *CYP2C19* EM PACIENTES USUÁRIOS DO
CLOPIDOGREL: estudo piloto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Fernanda Rodrigues Soares.

Belo Horizonte

2024

043

Silva, Karwhory Wallas Lins da.

Farmacogenética do CYP2C19 em pacientes usuários do clopidogrel: estudo piloto [manuscrito] / Karwhory Wallas Lins da Silva. – 2024.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Fernanda Rodrigues Soares.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Medicina de Precisão. 3. Polimorfismo Genético. 4. Angioplastia. 5. Citocromo P-450 CYP2C19. 6. Inibidores da Agregação de Plaquetas. I. Soares, Fernanda Rodrigues. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"FARMACOGENÉTICA DO CYP2C19 EM PACIENTES USUÁRIOS DO CLOPIDOGREL: estudo piloto "

Karwhory Wallas Lins da Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Marcela Forgerini

Universidade Estadual Paulista

Marcelo Rizzatti Luizon

Universidade Federal de Minas Gerais

Fernanda Rodrigues Soares

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Belo Horizonte, 24 de junho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Rodrigues Soares, Usuário Externo**, em 24/06/2024, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Rizzatti Luizon, Professor do Magistério Superior**, em 24/06/2024, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcela Forgerini, Usuário Externo**, em 24/06/2024, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3318665** e o código CRC **5B2F406D**.

A minha mãe, por tudo, todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meu agradecimento total a Deus por ter me sustentado todos os dias.

A minha mãe Gelva da Silva por tudo, todos os dias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento, tão necessário para a formação de profissionais qualificados através da pós-graduação *stricto sensu*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e sua coordenação por proporcionar a oportunidade do ensino de excelência com grandes Professores Geneticistas.

Ao Prof. Dr. Eduardo Tarazona por me aceitar em seu grupo de pesquisa. Obrigado pela confiança, orientação e por me mostrar como fazer ciência de qualidade. E a Camila Zolini de Sá por ter um olhar diferenciado na gestão do Laboratório de Diversidade Genética Humana (LDGH).

Ao companheiro de mestrado Gabriel Batista, pela parceria durante o mestrado na UFMG e a todos integrantes do LDGH, por todo apoio e aprendizado que adquiri com cada um.

Aos colegas de sala de aula (Kethelyn Rezende Soares, Grazielle Pimentel Almeida e Giovanni Vitral) por tornarem essa jornada leve. Aos amigos Joannan Lima Silva e Tatiane Martins Pinheiro por me resgatarem nos feriados e finais de semana.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Integrada (G3), pela colaboração nos experimentos de banda e momentos de descontração.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares, um ser humano que admiro como pessoa, como geneticista, como pesquisadora, como professora e como comunicadora/divulgadora científica. Você me inspirou todos os dias em Uberaba!

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Genética de Populações e Farmacogenética. Principalmente os que trabalharam comigo na bancada do Laboratório de Genética Humana. Vocês são incríveis, ops *increíble!*

Aos funcionários do serviço de cardiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro por toda colaboração na coleta e acompanhamento dos pacientes.

Aos voluntários que participaram desta pesquisa, cedendo as amostras biológicas, vocês são a parte principal deste trabalho.

Aos integrantes da banca examinadora, por aceitarem o convite, disponibilizando seu tempo para contribuir de forma significativa com este trabalho.

Aos amigos que estão espalhados em cada estado do Brasil, mesmo de longe estiveram interagindo e apoiando sempre que precisei.

A todos aqueles não mencionados, que de alguma maneira contribuíram com essa etapa da minha vida.

*“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento.
Porque melhor é sua mercadoria do que a mercadoria de prata,
e a sua renda do que o ouro mais fino.”*

Provérbios 3.13-14.

RESUMO

Após a realização da Intervenção Coronária Percutânea (ICP), os pacientes devem fazer o uso diário de antiagregante plaquetário, como o clopidogrel. O clopidogrel é um pró-fármaco que necessita de ativação hepática por meio da enzima Citocromo P450 (CYP) 2C19. As alterações no gene *CYP2C19* podem comprometer a ativação do clopidogrel, resultando em falha terapêutica ou efeitos adversos. O objetivo geral deste trabalho piloto foi verificar a viabilidade de implementação de testes de farmacogenética do gene *CYP2C19* em pacientes usuários do clopidogrel. E os específicos foram: implantar protocolos de trabalho de bancada pela primeira vez no Laboratório de Genética Humana (LGH) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), genotipar os alelos estrelas de importância farmacogenética do gene *CYP2C19*; e verificar se há relação dos resultados de genotipagem com os resultados de agregometria. Para alcançar esses objetivos, o projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFTM, sob número 6.233.152. Os pacientes pós ICP foram convidados a participar do estudo no serviço de cardiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM). Durante o recrutamento dos pacientes foram obtidos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e as amostras biológicas (até 6,0 mL de sangue), coletadas em um tubo com *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* e outro com citrato. Os ensaios laboratoriais (extração, purificação e quantificação do DNA genômico; genotipagem de *Single Nucleotide Variants* do gene *CYP2C19*; e agregometria) foram realizados no LGH da UFTM. Os dados foram relatados de forma descritiva, expressos em gráficos e tabelas. A padronização dos protocolos de recrutamento de pacientes foi realizada seguindo os parâmetros preconizados pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 466/2012, e a padronização dos experimentos de bancada foi realizada buscando cumprir as normas de biossegurança e as boas práticas laboratoriais. Foram genotipados um total de 146 pacientes e destes, 51 também foram submetidos ao teste de agregometria. Foi verificado que o genótipo mais prevalente foi *1/*1 (46,6%) (metabolizador normal), seguido por *1/*17 (24,7%) (metabolizador rápido) e por *1/*2 (metabolizador intermediário). Não foram encontrados indivíduos com *3 e não foram encontrados indivíduos com o genótipo *2/*2 (metabolizador lento). A frequência alélica do rs4244285 (*2) foi 0,12; e do rs12248560 (*17) foi 0,19. A maior frequência (n=26 pacientes) de agregometria foi verificada nos valores entre 104 a 208 PRU, seguida de 10 pacientes que apresentaram valor de PRU entre 52 a 104. Do total analisado, 14 (25,5%) pacientes foram considerados resistentes (PRU > 208) e 37 (74,5%) não resistentes (PRU < 208). A maioria dos genótipos avaliados apresentam valores de PRU < 208, com exceção do genótipo *1/*17. Conclui-se que é possível executar um estudo farmacogenético para investigar polimorfismos no gene *CYP2C19* de interesse farmacogenético em pacientes usuários de clopidogrel no HC-UFTM, sem ter nenhum trabalho do mesmo tipo realizado anteriormente. Espera-se que o estudo continue e que o número de pacientes aumente para aumentar as evidências farmacogenéticas sobre o gene *CYP2C19* em pacientes usuários do clopidogrel na população brasileira.

Palavras-chave: Medicina de precisão. Polimorfismo genético. Angioplastia. Citocromo P-450 CYP2C19. Inibidores da agregação de plaquetas.

ABSTRACT

After Percutaneous Coronary Intervention (PCI), patients should make daily use of antiplatelet agents, such as clopidogrel. Clopidogrel is a prodrug that requires hepatic activation by the enzyme Cytochrome P450 (CYP) 2C19. Changes in the *CYP2C19* gene can compromise clopidogrel activation, resulting in treatment failure or adverse effects. The general objective of this pilot study was to verify the feasibility of implementing pharmacogenetics tests of the *CYP2C19* gene in patients using clopidogrel. And the specific ones were: to implement bench work protocols for the first time at the Human Genetics Laboratory (LGH) of the Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), to genotype the star alleles of pharmacogenetic importance of the *CYP2C19* gene; and to verify whether there is a relationship between the genotyping results and the aggregometry results. To achieve these objectives, the research project was submitted to and approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings of UFTM, under number 6.233.152. Post-PCI patients were invited to participate in the study at the cardiology service of the Hospital de Clínicas of the Federal University of Triângulo Mineiro (HC-UFTM). During patient recruitment, the Informed Consent Form was obtained and biological samples (up to 6.0 mL of blood) were collected in a tube with Ethylenediamine Tetraacetic Acid and another with citrate. Laboratory assays (extraction, purification and quantification of genomic DNA; genotyping of Single Nucleotide Variants of the *CYP2C19* gene; and aggregometry) were performed at the LGH of UFTM. The data were reported descriptively, expressed in graphs and tables. The standardization of patient recruitment protocols was carried out following the parameters recommended by Collegiate Board Resolution No. 466/2012, and the standardization of bench experiments was carried out in order to comply with biosafety standards and good laboratory practices. A total of 146 patients were genotyped, and of these, 51 were also submitted to the aggregometry test. The most prevalent genotype was *1/*1 (46.6%) (normal metabolizer), followed by *1/*17 (24.7%) (rapid metabolizer) and *1/*2 (intermediate metabolizer). No individuals were found with *3 and no individuals with the *2/*2 genotype (slow metabolizer) were found. The allelic frequency of rs4244285 (*2) was 0.12; and of rs12248560 (*17) was 0.19. The highest frequency (n=26 patients) of aggregometry was observed in values between 104 and 208 PRU, followed by 10 patients who presented PRU values between 52 and 104. Of the total analyzed, 14 (25.5%) patients were considered resistant (PRU > 208) and 37 (74.5%) were nonresistant (PRU < 208). Most of the genotypes evaluated have PRU values < 208, with the exception of genotype *1/*17. It is concluded that it is possible to perform a pharmacogenetic study to investigate polymorphisms in the gene *CYP2C19* of pharmacogenetic interest in patients using clopidogrel at HC-UFTM, without having any work of the same type previously performed. It is expected that the study will continue and that the number of patients will increase to increase the pharmacogenetic evidence on the gene *CYP2C19* in clopidogrel users in the Brazilian population.

Keywords: Precision medicine. Genetic polymorphism. Angioplasty. Cytochrome P-450 CYP2C19. Platelet aggregation inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do clopidogrel	20
Figura 2 – Mecanismo de inibição da agregação plaquetária do clopidogrel ao se ligar ao receptor P2Y ₁₂	21
Figura 3 – Mecanismo de leitura da agregação plaquetária realizada pelo VerifyNow™	22
Figura 4 – Caminho farmacocinético do clopidogrel ingestão no organismo	23
Figura 5 – Metabólitos originados a partir da biotransformação do pró-fármaco clopidogrel	24
Figura 6 – Fluxograma de recrutamento dos pacientes	35
Figura 7 – Principais etapas de extração do DNA a partir do sangue	38
Figura 8 – Esquema de preparação da solução de trabalho, da quantificação dos padrões e das amostras	39
Figura 9 – Representação gráfica de dados de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real do software StepOne v2.2.2	40
Figura 10 – Frequência dos genótipos de <i>CYP2C19</i> dos pacientes usuários do clopidogrel no HC-UFTM	42
Figura 11 – Frequência dos fenótipos preditos de <i>CYP2C19</i> dos pacientes usuários do clopidogrel no HC-UFTM	43
Figura 12 – Esquema de ativação e ação do clopidogrel, prasugrel e ticagrelor	45
Figura 13 – Distribuição dos indivíduos por valores de agregometria em PRU	46
Figura 14 – Representação gráfica dos valores de PRU distribuídos por genótipos	48
Figura 15 – Representação gráfica dos valores de PRU distribuídos por fenótipos preditos	49
Quadro 1 – Soluções e volumes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real	32
Quadro 2 – Descrição das sondas que foram utilizadas na genotipagem	32
Quadro 3 – Soluções, volumes e funções das soluções utilizadas na padronização do protocolo de extração	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre SNPs, alelos estrela do <i>CYP2C19</i> e atividade enzimática predita ..	27
Tabela 2 – Exemplos de diplótipos do <i>CYP2C19</i> e fenótipos preditos correspondentes	27
Tabela 3 – Características demográficas dos pacientes do estudo	41
Tabela 4 – Recomendações da terapia antiplaquetária baseada no fenótipo predito para pacientes cardiovasculares	44
Tabela 5 – Frequência alélica dos alelos estrela estudados em comparação com os resultados de Rodrigues-Soares <i>et al.</i> (2018) e Naslavsky <i>et al.</i> (2022)	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT: serotonina/hidroxitriptamina

ABCB1: Binding Cassette Subfamily B Member 1

ADP: adenosina difosfato

AGHU: Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários

AVE: Acidente Vascular Encefálico

Ca²⁺: Cálcio

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CES1: Carboxylesterase 1

COX-1: Cicloxigenase 1

CPIC[®]: *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

CYP: Citocromo P450

Cys: *Cysteine*

DCV: Doenças Cardiovasculares

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

DPWG: Dutch Pharmacogenetics Working Group

EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EPIs: Equipamentos de Proteção Individual

EQC: *Electronic Quality Control*

GIb: Glicoproteína Ib

GPIIb/IIIa: Glicoproteína IIb/IIIa

GWAS: *Genome Wide Association Study*

HC-UFTM: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

ICP: Intervenção Coronária Percutânea

LGH: Laboratório de Genética Humana

mRNA: *messenger RNA*

P2Y₁₂: Purinérgico 2Y₁₂

PGE1: Prostaglandina E1

PON1: Paraoxonase 1

PRU: *P2Y₁₂ Reaction Units*

RBC: *Red Blood Cells*

RENAME: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RNA: *Ribonucleic Acid*

RNPGx: Réseau National de Pharmacogénétique Hospitalière

SCA: Síndrome Coronariana Aguda

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*

SNVs: *Single Nucleotide Variants*

SUS: Sistema Único de Saúde

TAP: Teste de Agregação Plaquetária

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TXA2: tromboxanos A2

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

vWF: fator von Willebrand

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Panorama das Doenças Cardiovasculares no mundo e no Brasil.....	17
2.2 Hemostasia Primária, Secundária e Terciária	18
2.3 Fármacos antiagregantes plaquetários	19
2.3.1 Clopidogrel: apresentação, indicações e características.....	20
2.3.2 Clopidogrel: farmacodinâmica.....	20
2.3.3 Avaliação da agregação plaquetária.....	21
2.3.4 Clopidogrel: farmacocinética.....	23
2.3.5 Clopidogrel: interferentes da resposta, falhas terapêuticas e reações adversas.....	24
2.4 Farmacogenética e Farmacogenômica do Clopidogrel	25
2.4.1 Gene e enzima CYP2C19.....	26
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo Geral.....	29
4.2 Objetivos Específicos	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1 Aspectos Éticos e Desenho do Estudo.....	30
5.2 Amostra do Estudo	30
5.2.1 Locais do estudo.....	30
5.2.2 Critérios de inclusão dos voluntários	30
5.2.3 Critérios de exclusão dos voluntários.....	31
5.3 Experimentos laboratoriais.....	31
5.3.1 Coleta e Armazenamento das Amostras Biológicas	31
5.3.2 Extração, Purificação e Quantificação do DNA Genômico	31
5.3.3 Genotipagem de SNVs do Gene <i>CYP2C19</i>	32
5.3.4 Avaliação da Agregação Plaquetária.....	33
5.4 Análises dos Dados	33
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6.1 Padronização dos Protocolos de Recrutamento de Pacientes	34
6.2 Padronização da Coleta de Amostras Biológicas	36
6.3 Padronização dos Protocolos de Bancada.....	37
6.3.1 Teste de agregação plaquetária	37
6.3.2 Extração de DNA a partir do sangue total.....	37
6.3.3 Quantificação de DNA por Qubit™.....	39

6.3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	40
6.4 Características Demográficas dos Pacientes do Estudo	41
6.5 Frequência Genotípica e Inferência de Fenótipo Predito	42
6.6 Frequência Alélica	45
6.7 Agregação Plaquetária	46
6.8 Relação Genótipo X Agregometria (PRU).....	47
6.9 Relação Fenótipo Predito X Agregometria (PRU).....	48
7 CONCLUSÕES.....	50
8 PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A – TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	63
APÊNDICE B – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DA COLETA DE SANGUE.....	65
APÊNDICE C – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO TESTE DE AGREGOMETRIA	67
APÊNDICE D – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DO SANGUE TOTAL	71
APÊNDICE E – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	75
APÊNDICE F – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO TESTE DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	79
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP-UFTM	87

1 INTRODUÇÃO

O clopidogrel é o antiagregante plaquetário considerado padrão-ouro utilizado em todo o mundo, sendo o primeiro na lista dos mais prescritos em diversos países, devido ao seu perfil de segurança clínica e disponibilidade na versão genérica, o que facilita o acesso dos usuários (Pereira *et al.*, 2019; Schilling; Dingemans; Ufer, 2020). No Brasil, ele faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2022).

Trata-se de um pró-fármaco metabolizado em duas etapas oxidativas por enzimas hepáticas do Citocromo P450 (CYP) para sua forma metabólica ativa, de forma que a enzima CYP2C19 é a isoforma que contribui majoritariamente para essas reações. O metabólito ativo (thiol H4) liga-se a uma cisteína livre do receptor Purinérgico 2Y₁₂ (P2Y₁₂), uma proteína da membrana das plaquetas, e bloqueia irreversivelmente a ligação da adenosina difosfato (ADP) e impede a ativação do receptor, evitando a agregação das plaquetas (Savi *et al.*, 2000).

Embora no Brasil o clopidogrel seja o medicamento de escolha e amplamente utilizado em pacientes após a Intervenção Coronária Percutânea (ICP) para prevenir eventos aterotrombóticos, a resposta individual ao pró-fármaco é altamente variável, podendo alguns pacientes apresentarem uma hiporresponsividade, resistência ao medicamento ou falha terapêutica, enquanto outros indivíduos podem apresentar reações adversas medicamentosas (Shahabi; Dubé, 2015; Schilling; Dingemans; Ufer, 2020).

As variações na resposta ao clopidogrel dependem de fatores não-genéticos e genéticos (Geisler *et al.*, 2008; Nicolau *et al.*, 2021). Acerca dos fatores genéticos, as alterações no gene *CYP2C19* que codifica a enzima CYP2C19 podem modificar sua atividade tanto para a perda ou para ganho de função, o que pode influenciar na ativação do clopidogrel (Carlquist *et al.*, 2013; Lam, 2018). A investigação farmacogenética pode auxiliar a prever a resposta ao clopidogrel e, portanto, guiar a terapia farmacológica de pacientes cardiovasculares (Lee *et al.*, 2022).

Vários estudos de meta-análise demonstraram que pacientes submetidos a ICP, sob tratamento com clopidogrel e portadores de variantes de perda de função, possuem maior risco de sofrerem eventos cardiovasculares importantes (Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), Acidente Vascular Encefálico (AVE) e morte cardiovascular) e trombose de *stent* (Sorich *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2015; Biswas *et al.*, 2021; Xi *et al.*, 2017), além de maior reatividade plaquetária (Frere *et al.*, 2008; Brandt *et al.*, 2007).

O *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC®) recomenda que após a genotipagem do gene *CYP2C19*, pacientes com Síndrome Coronariana Aguda (SCA) e/ou ICP classificados como metabolizadores lentos e intermediários façam preferencialmente o uso de antiagregantes plaquetários alternativos (prasugrel ou ticagrelor), para evitar possíveis efeitos cardiovasculares (Lee *et al.*, 2022).

Diversos estudos com pacientes com SCA e/ou ICP tem servido como base para a aplicação de um tratamento personalizado de acordo com as informações genéticas do *CYP2C19*, sugerindo a prescrição de clopidogrel 75 mg para os metabolizadores normais, rápidos e ultrarrápidos; e prasugrel/ticagrelor para os metabolizadores intermediários ou lentos. Essas estratégias diminuem a ocorrência de eventos cardiovasculares importantes em comparação com a estratégia de tratamento convencional (prescrição de 75 mg de clopidogrel) (Cavallari; Momary, 2018; Claassens *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2020; Collet *et al.*, 2009).

No entanto, essas recomendações são baseadas em evidências de estudos clínicos realizados, majoritariamente, com pacientes de ancestralidades europeia ou asiática, existindo pouca evidência de variantes do gene *CYP2C19* com pacientes usuários de clopidogrel na população brasileira (Marchini *et al.*, 2017). Assim, são necessários estudos para investigar a associação dessas *Single Nucleotide Variants* (SNVs) com desfechos farmacológicos no contexto das doenças cardiovasculares em outras populações e verificar a aplicabilidade dessas orientações em populações miscigenadas como a brasileira.

A farmacogenética do clopidogrel e do *CYP2C19* é uma estratégia que pode nortear a terapia farmacológica de antiagregação plaquetária. Dentre as vantagens da farmacogenética clínica estão o aumento da eficácia da terapia, diminuição dos efeitos adversos, individualização da posologia, apoio para farmacoeconomia e contribuição com a adesão terapêutica (Stein *et al.*, 2020; Jiang; You, 2015).

Para consolidar a farmacogenética clínica do clopidogrel são necessários estudos que envolvam pacientes cardiovasculares com prescrição de clopidogrel. Dentre os benefícios envolvidos neste trabalho, estão: geração de conhecimento para posterior implantação da farmacogenética do clopidogrel no Brasil; uso do teste de agregometria *point-of-care* para avaliar a resposta ao clopidogrel; e para os pacientes, a critério médico, poderão ter seu tratamento redirecionado para outro fármaco que possa ter uma resposta terapêutica mais adequada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Panorama das Doenças Cardiovasculares no mundo e no Brasil

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo, com exceção dos países em desenvolvimento, em que elas não são a principal causa de mortalidade. Porém, com o controle das doenças infecciosas e causas de mortalidade materno-infantil, elas tendem a se tornarem prioritárias (Nascimento *et al.*, 2018).

As doenças cardiovasculares acometem milhares de indivíduos no mundo, destacando-se a doença aterosclerótica, que é a principal causa da SCA (Rocha; Aguiar, 2020). Dentre suas causas estão o estilo de vida, os fatores ambientais (idade, sexo, hiperlipidemia, hipertensão arterial, tabagismo) e fatores genéticos. Seus impactos na vida dos seres humanos envolvem altas taxas de morbimortalidade e requerem altos custos com medicamentos e outros recursos hospitalares (Libby, 2013; Malakar *et al.* 2019). Há expectativa do aumento deste grupo de doenças em países em desenvolvimento, como o Brasil (Barros e Silva *et al.*, 2020).

A SCA é composta pela angina instável e o IAM como resultado de erosão ou ruptura da placa aterosclerótica seguida da formação de trombo que interrompe totalmente ou parcialmente o fluxo sanguíneo (Teich; Araujo, 2011; Nicolau *et al.*, 2021).

A ICP, também conhecida como angioplastia coronária, inclui o procedimento de implantação do dispositivo intracoronário (*stent*) para restabelecimento do fluxo sanguíneo (Feres *et al.*, 2017).

Segundo um levantamento realizado entre agosto de 2010 e abril de 2014, 70% dos pacientes com SCAs são do sexo masculino; 31,6% apresentavam diabetes mellitus e 74,6% hipertensão arterial sistêmica. Os pacientes com SCA recebem durante o período de internação a prescrição de dupla antiagregação (aspirina e inibidor de P2Y₁₂), estatina, betabloqueador com adição de terapia de reperfusão nos casos de IAM. Este mesmo estudo identificou falhas na terapia das SCA, que resulta em falhas durante a admissão e seguimento, enfatizando que a prescrição baseada em evidência poderia minimizar o risco de tais eventos na população brasileira (Barros e Silva *et al.*, 2020).

Todos os custos diretos e indiretos com internações, diagnósticos, cirurgias, tratamentos, perda de produtividade ligados a aspectos social e emocional dos pacientes e familiares que apresentam SCA, causam um impacto negativo significativo na economia (Magee *et al.*, 2012).

2.2 Hemostasia Primária, Secundária e Terciária

As plaquetas desempenham um papel crucial no processo aterotrombótico (Ruggeri, 2002), pois são fragmentos oriundos do citoplasma dos megacariócitos presentes na medula óssea que exercem diversas funções (cicatrização de feridas, inflamação, angiogênese) no vaso sanguíneo dos seres humanos, mas a principal, é a formação do trombo necessário para interromper a hemorragia e reparar o vaso sanguíneo (Falcão *et al.*, 2013). Portanto, elas são essenciais em processos fisiológicos para tamponar o sangramento do vaso sanguíneo, participando das três etapas da hemostasia: resposta vascular, formação do tampão hemostático (hemostasia primária) e formação do coágulo de fibrina (hemostasia secundária) (Gaspard, 2004; Silverthorn *et al.*, 2011; Hoffbrand; Moss; Pettit, 2008).

Na resposta vascular, a diminuição do fluxo sanguíneo permite a ativação de plaquetas. Na hemostasia primária ocorre a adesão, secreção e agregação plaquetária; e na hemostasia secundária ocorre a cascata de coagulação que culmina na formação do coágulo (Gaspard, 2004; Silverthorn *et al.*, 2011; Hoffbrand; Moss; Pettit, 2008).

Na hemostasia primária, o primeiro evento é uma vasoconstrição para limitar a perda de sangue. Paralelamente, a exposição do colágeno subendotelial à circulação sanguínea induz a ligação ao fator von Willebrand (vWF), que juntos capturam, por meio dos receptores Glicoproteína Ib (Gib) as plaquetas do sangue. Essa fase é chamada de adesão plaquetária (Gelbenegger; Jilma, 2022).

Uma vez a plaqueta aderida, a adesão faz com que as plaquetas secretem grânulos densos, como ADP, serotonina/hidroxitriptamina (5-HT) e cálcio (Ca^{+2}) e outros ligantes. A 5-HT promove a vasoconstrição local para interromper o sangramento. A ciclo-oxigenase libera o tromboxanos que vão potencializar a ativação plaquetária. Além disso, a exposição de fosfolípidos plaquetários fornece uma superfície para as enzimas da hemostasia secundária (Gelbenegger; Jilma, 2022; Vayne; Gruel; Pouplard, 2021).

Na etapa de agregação plaquetária, a ADP, ao ligar-se ao receptor $P2Y_{12}$, por meio da formação de pontes de fibrinogênio, induz alterações conformacionais no receptor GPIIb/IIIa que possibilita a fixação do fibrinogênio. O produto final desses eventos é o tampão hemostático primário/temporário (Periyah *et al.*, 2014; Vayne; Gruel; Pouplard, 2021).

Na hemostasia secundária a trombina converte o fibrinogênio em fibrina em volta das plaquetas agregadas, que é reticulada pelo fator XIII para formar um trombo estável que interrompe o sangramento. Existe a via intrínseca e a extrínseca. Na via intrínseca temos os fatores: XII, XI, IX, VII, precalicreína, e cininogênio de alto peso molecular; na via extrínseca,

os fatores: VII e fator tecidual. Essas vias chegam a um ponto comum que envolve os fatores: X, V, II e I, cuja função é converter o fibrinogênio em fibrina e formar um coágulo estável (Ferreira *et al.*, 2010).

A hemostasia terciária é também chamada de fibrinólise, cuja função é desfazer o coágulo após a lesão reparada, restaurar o fluxo sanguíneo e lúmen vascular. Durante a hemostasia secundária, o plasminogênio – enzima inativa – é incorporado ao coágulo. Depois da formação do coágulo, o endotélio secreta moléculas (protrombina, os fatores V e o fibrinogênio) que ativam o plasminogênio, tornando-se plasmina, enzima que vai dissolver o coágulo (Eggres; Araújo, 2015).

O mecanismo de formação do coágulo/trombo é semelhante em situações fisiológicas e patológicas (Longo *et al.*, 2013). Os principais agonistas que iniciam a agregação plaquetária são: tromboxano A2 (TXA2), ADP e a trombina (Mackie; Pitillo, 1985).

Em condições patológicas, elas podem ser agregadas e ativadas durante a ruptura da placa aterosclerótica e também quando há presença de *stent* (Garg; Uretsky; Lev, 2007). Nesse sentido, as plaquetas são importantes agentes em eventos trombóticos, principalmente em pacientes acometidos por alguma SCA ou submetidos a ICP (Falcão *et al.*, 2013).

2.3 Fármacos antiagregantes plaquetários

Atualmente, na clínica, existem cinco alvos farmacológicos nos quais os fármacos podem atuar nas plaquetas: ciclooxigenase 1 (COX-1), receptores P2Y₁₂, receptores Glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), receptores 1 ativados por protease e fofodiesterases (Gelbenegger; Jilma, 2022).

Os receptores P2Y₁₂ exercem diversas funções na inflamação e trombose induzidas pela ligação da ADP, como a secreção de TXA2, trombina e outros grânulos que ativam o receptor GPIIb/IIIa, a agregação plaquetária por cisalhamento, a estabilização de placas revestidas de colágeno e placas aterosclerótica rompida (Gelbenegger; Jilma, 2022). Os inibidores de P2Y₁₂ tienopiridínicos (ticlopidina, clopidogrel e prasugrel) são antagonistas irreversíveis do receptor P2Y₁₂ (Varon; Spectre, 2009) e os ciclopentil-triazolopirimidinas (ticagrelor, cangrelor e elinogrel) são antagonistas reversíveis do receptor P2Y₁₂ (Badimon; Vilahur, 2013).

2.3.1 Clopidogrel: apresentação, indicações e características

O clopidogrel constitui-se um agente farmacológico antiplaquetário, cuja função é inativar as plaquetas. Sendo utilizado na profilaxia e prevenção de eventos cardiovasculares secundários (Armstrong; Golan, 2014). Ele tem nome o comercial de Plavix[®] e sua versão genérica compõe a RENAME, é utilizada em protocolos de tratamento em instituições que fornecem os serviços do SUS.

É utilizado na clínica, junto com o ácido acetilsalicílico, para tratar angina instável, infarto agudo do miocárdio sem ou com elevação do segmento ST, prevenção de trombos na região das placas, infarto do miocárdio recente, AVE e doença arterial periférica estabelecida. A terapia é iniciada com uma dose de ataque de 300 mg para alcançar a concentração alvo, seguida de 75 mg para manter a concentração plasmática ao dia com uma dose diária de 75 a 325 mg de ácido acetilsalicílico (Zehnder, 2017).

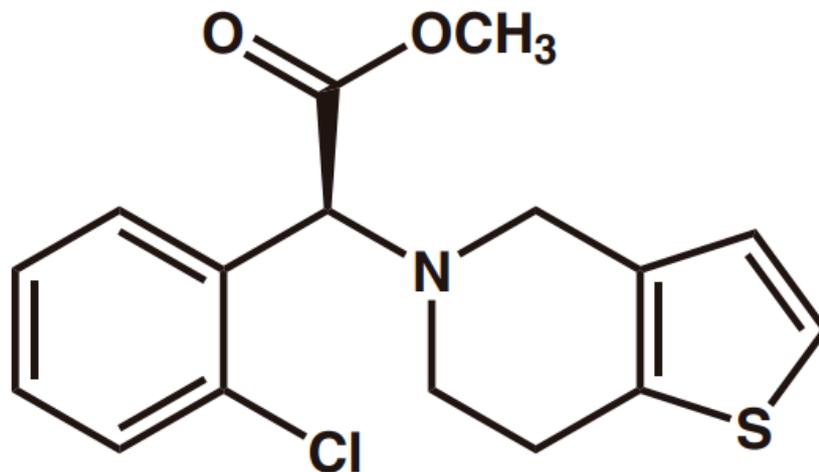


Figura 1 – Estrutura química do clopidogrel.

Fonte: Adaptado de Lüllman *et al.*, 2017.

2.3.2 Clopidogrel: farmacodinâmica

A forma ativa do clopidogrel possui ação irreversível de antagonizar o receptor P2Y₁₂ bloqueando a agregação plaquetária mediada por qualquer agonista (Varon; Spectre, 2009). A ligação no receptor ocorre através de pontes dissulfeto com resíduos de cisteína (Cys17 e Cys270), que desfaz a estrutura oligomérica do receptor, fazendo ele perder a capacidade de ligar-se a ADP (Savi *et al.*, 2006). A ausência de ligação a ADP impede a ativação do receptor GP IIb/IIIa, impossibilitando a agregação plaquetária (Schafer, 1996; Hirsh; Bhatt, 2004;

Majerus; Tollefsen, 2003). A **Figura 2** apresenta o mecanismo de inibição da agregação plaquetária do clopidogrel ao se ligar ao receptor P2Y₁₂.

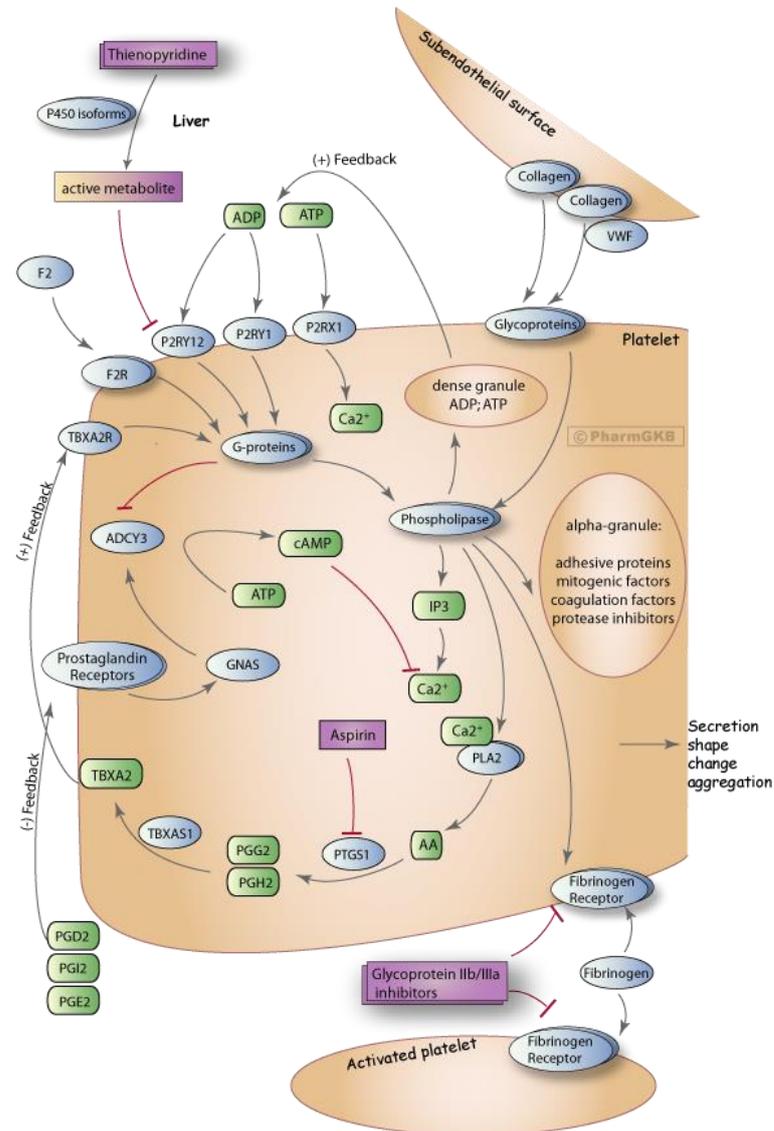


Figura 2 – Mecanismo de inibição da agregação plaquetária do clopidogrel ao se ligar ao receptor P2Y₁₂.

Fonte: Sangkuhl *et al.*, 2011.

2.3.3 Avaliação da agregação plaquetária

O teste de avaliação da agregação plaquetária se tornou bastante útil com o aumento do uso dos inibidores do receptor Purinérgico 2Y₁₂ (P2Y₁₂) que fica localizado na superfície das plaquetas. Uma dos equipamento que permite avaliar o desfecho farmacológico dos antiagregantes plaquetários é usando o equipamento VerifyNow™ (Almandoz *et al.*, 2014).

VerifyNow™ PRUtest é o teste padrão ouro para avaliar a resposta de antiagregação plaquetária ao clopidogrel, prasugrel e ticagrelor. A metodologia empregada no equipamento consiste em verificar a agregação das plaquetas por meio da transmitância de luz. Para ativação das plaquetas, o cartucho do teste tem ADP, prostaglandina E1 (PGE1) e fibrinogênio que são preenchidos pelo sangue. As plaquetas agregadas, formam grumos no plasma, deixando a luz passar. Quanto maior a agregação plaquetária, maior a transmitância de luz (**Figura 3**). Os resultados são registrados em *P2Y₁₂ Reaction Units* (PRU), que é calculada como uma função da taxa e da extensão da agregação plaquetária no canal de ADP (Yamaguchi *et al.*, 2012).

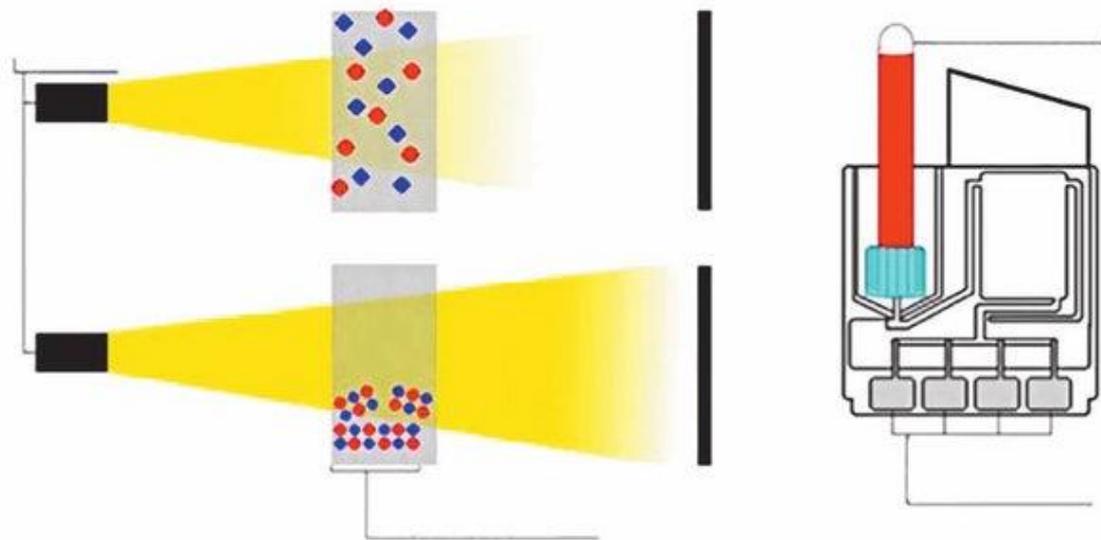


Figura 3 – Mecanismo de leitura da agregação plaquetária realizada pelo VerifyNow™.

Fonte: Adaptado de Demertzis; Cassina; Casso, 2016.

Se o fármaco não manifestar o efeito esperado, a agregação plaquetária será aumentada (PRU>208), que significa falha na terapia farmacológica do clopidogrel (Tantry *et al.*, 2013; Söderberg; Holm; Gupta, 2020). Os pacientes hiporresponsivos podem ter complicações tromboembólicas e os hiper-responsivos podem ter complicações hemorrágicas graves (Almandoz *et al.*, 2014).

O emprego desta avaliação em pacientes pode nortear a dupla terapia de antiagregação plaquetária, permitindo identificar aspectos de custo-benefício, e quais pacientes podem fazer uso de clopidogrel, prasugrel ou ticagrelor, dependendo da disponibilidade de medicamentos genéricos e das condições socioeconômicas de cada paciente (Lomakin *et al.*, 2019).

2.3.4 Clopidogrel: farmacocinética

O clopidogrel é administrado oralmente, sendo absorvido no intestino. Possui meia vida de aproximadamente 8 horas (Korolkovas, 2004; Cavallari; Momary, 2018). A maior parte do pró-fármaco (85%) é hidrolisado em metabólitos inativos por enzimas esterases (CES1 (*Carboxylesterase 1*) e outras) que formam o ácido carboxílico (**Figura 4**) (Sanguhl; Klein; Altman, 2010). O principal composto circulante no sangue é um metabólito inativo (SR26334 ou M1) (**Figura 5**) (Kuszynski; Lauver, 2022).

A outra via que o pró-fármaco segue (15%) é a via de ativação, no qual é metabolizado extensivamente por enzimas do Citocromo P450 localizadas no fígado (Korolkovas, 2004; Cavallari; Momary, 2018). Estas enzimas (principalmente a CYP2C19 e CYP3A4) convertem o pró-fármaco em diversos metabólitos, por meio de duas etapas oxidativas, na qual primeiro é obtido o 2-oxo-clopidogrel, e posteriormente os isômeros de clopidogrel thiol, no qual H4 (ou M13) é o responsável pela ação farmacológica (**Figura 4 e 5**) (Sanguhl; Klein; Altman, 2010; Pereira *et al.*, 2019; Kuszynski; Lauver, 2022).

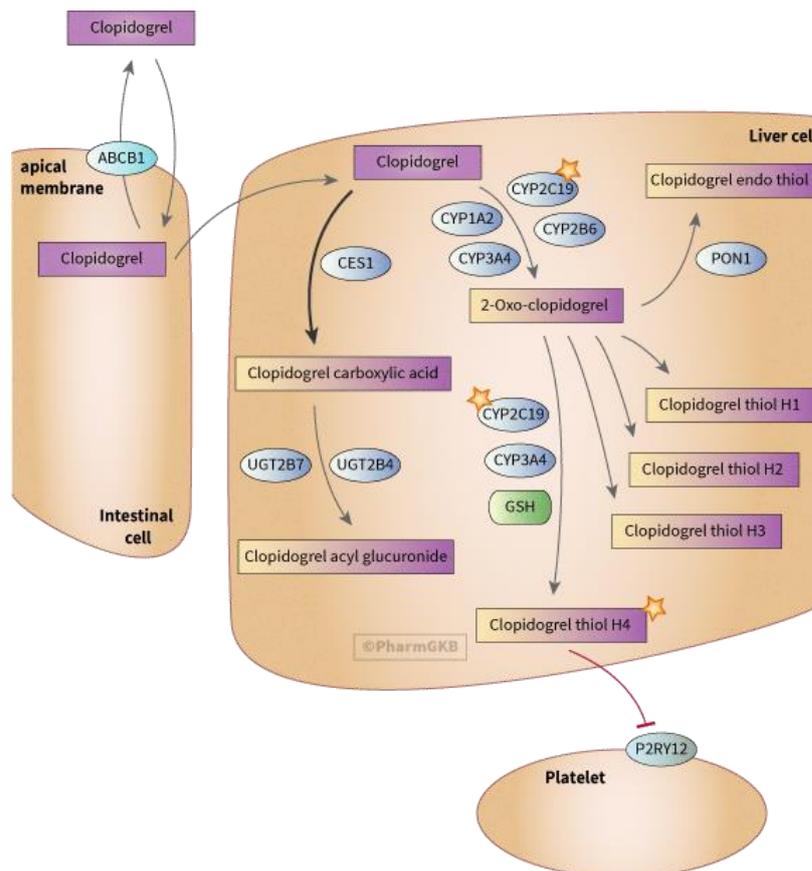


Figura 4 – Caminho farmacocinético do clopidogrel ingestão no organismo.

Fonte: Sanguhl; Klein; Altman, 2010.

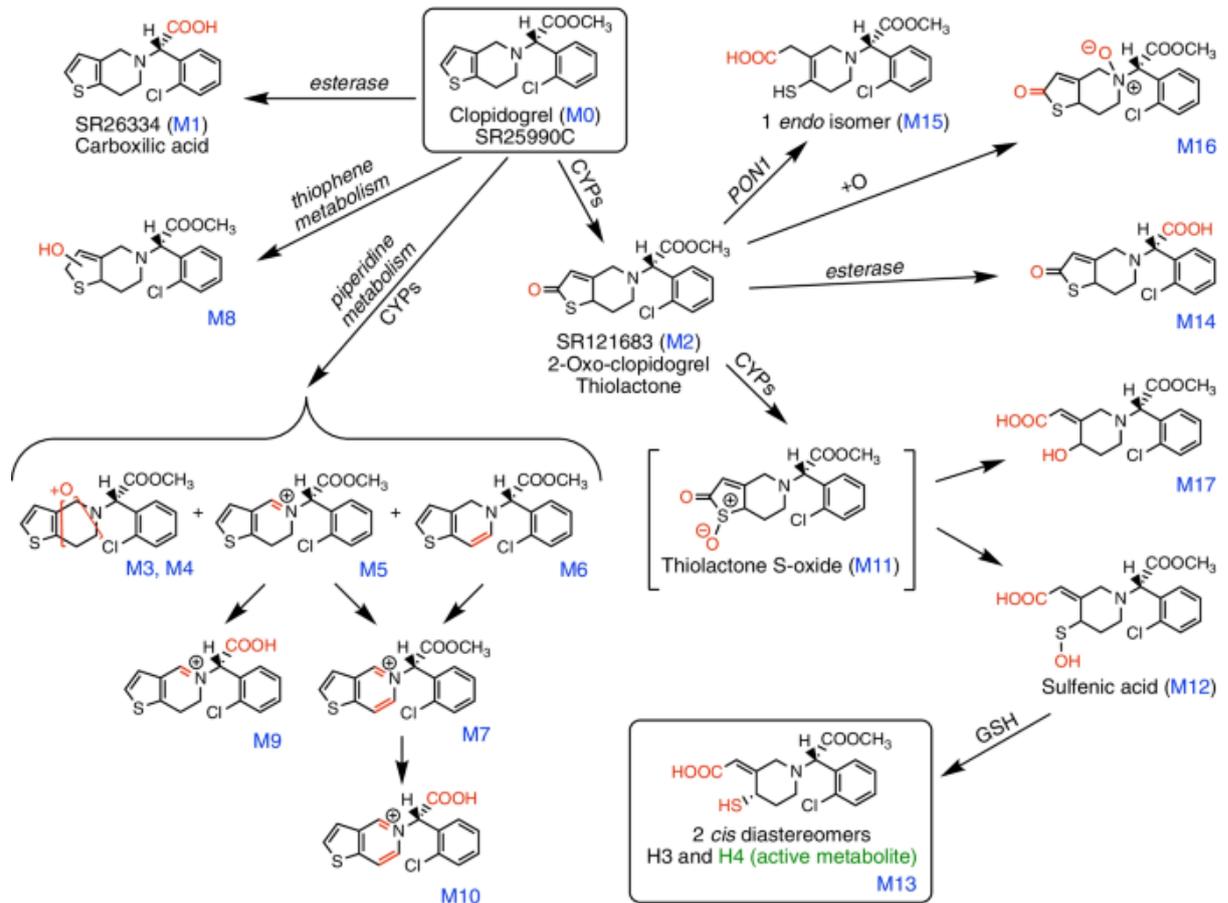


Figura 5 – Metabólitos originados a partir da biotransformação do pró-fármaco clopidogrel.

Fonte: Kuszynski; Lauver, 2022.

Cerca de 98% dos metabólitos (ativo e inativo) do clopidogrel ligam-se às proteínas do plasma, estendendo o efeito farmacológico por cinco dias (Korolkovas, 2004; Jacobson, 2004). A eliminação via renal é de 50%, e gastrointestinal de 46% (Korolkovas, 2004).

2.3.5 Clopidogrel: interferentes da resposta, falhas terapêuticas e reações adversas

A resposta ao clopidogrel depende de diversos fatores, tais como: genética, idade, sexo, interação medicamentosa, insuficiência renal, índice de massa corporal (Geisler *et al.*, 2008; Al-Azzam *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2022).

A interação medicamentosa com inibidores da bomba de prótons representa um outro mecanismo de resistência ao clopidogrel, visto que eles competem pelas isoformas de enzimas CYP que ativam o clopidogrel. A literatura também relata interação negativa entre bloqueadores de canais de cálcio e clopidogrel (Bhatt *et al.*, 2008).

A principal reação adversa ao clopidogrel são as complicações hemorrágicas, sendo o sangramento intracranial a maior causa de mortalidade e a hemorragia gastrointestinal é o local mais frequente de sangramento (Bhatt *et al.*, 2008).

As reações adversas ao clopidogrel comuns são dor torácica, edema, hipertensão, púrpura. Raramente pode ocorrer anormalidades das provas de função hepática, desconforto gastrointestinal, artralgia e tontura. E suas reações adversas graves incluem: fibrilação arterial, insuficiência cardíaca, fibrilação arterial, eritema multiforme, hemorragia gastrointestinal, anemia ou neutropenia, muito raramente há anormalidades da função renal (Armstrong; Golan, 2014).

O perfil de efeitos adversos do clopidogrel é considerado mais tolerável do que o da ticlopidina: os efeitos gastrointestinais do clopidogrel são semelhantes aos do ácido acetilsalicílico. As principais limitações do clopidogrel e, possivelmente, de outros membros da classe da tienopiridina, são atribuídas ao seu efeito antiplaquetário irreversível e à variabilidade na inibição plaquetária entre os indivíduos (Jacobson, 2004).

Alguns pacientes têm reações de hipersensibilidade ao ingerir o clopidogrel, que se manifesta tardiamente, com manejo difícil e geralmente apresenta hipersensibilidade cruzada a ticlopidina e prasugrel (Cheema *et al.*, 2011). O clopidogrel é contraindicado para quem apresenta distúrbio gastrointestinal ativo (Armstrong; Golan, 2014).

A não ativação enzimática do clopidogrel pode resultar em pacientes que não obtém o efeito farmacológico da molécula ativa do clopidogrel (falha terapêutica) ou risco de ocorrer alta reatividade plaquetária (resistência ao clopidogrel), que podem levar a ocorrência de um novo evento cardiovascular (morte cardiovascular, IAM, AVE e trombose de *stent*) (Biswas *et al.*, 2021).

Em contrapartida, a atividade aumentada da enzima CYP2C19 pode resultar em efeitos adversos ao clopidogrel, com plaquetas hiperresponsivas e consequentemente sangramento (Shahabi; Dubé, 2015; Ali *et al.*, 2022).

2.4 Farmacogenética e Farmacogenômica do Clopidogrel

A intervariabilidade na resposta dos usuários ao clopidogrel pode ser influenciada por variantes em vários genes, como *CYP2C19*, que codifica a principal enzima responsável pela metabolização do clopidogrel; *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1 (ABCB1)*, que codifica proteínas responsáveis pelo transporte do clopidogrel; *CES1*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP3A4* e *CYP3A5* que codificam enzimas responsáveis pela metabolização do clopidogrel;

PON1 (*Paraoxonase 1*), que codifica a paraoxonase-1, enzima facilitadora da ativação do clopidogrel; e *P2Y12*, que codifica o receptor plaquetário da ADP. Por necessitar de extensa metabolização das enzimas do Citocromo P450 para ser ativado, grande parte dos estudos farmacogenéticos com o clopidogrel são realizados investigando polimorfismos genéticos nos genes *CYP* (Cavallari; Momary, 2018; Hulot *et al.*, 2011; Malek *et al.*, 2008).

Os estudos farmacogenéticos do clopidogrel iniciais investigaram variações do gene *CYP2C19* com os níveis do metabólito ativo do clopidogrel e posteriormente foi realizado um Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS), que confirmou a associação (Pereira *et al.*, 2020). Enquanto outras variantes de diferentes genes possuem desfechos farmacológicos controversos, as variantes do gene *CYP2C19* tem uma associação amplamente estabelecida, por meio da replicação dos estudos em diferentes populações (Zhang *et al.*, 2017; Relling; Klein, 2011; Scott *et al.*, 2011, 2013; PHARMGKB, 2020).

Devido a isso, o CPIC[®] recomenda que a terapia dos pacientes com SCA e/ou ICP que receberam prescrição de clopidogrel seja guiada pela genotipagem e que os pacientes metabolizadores lentos e intermediários sejam tratados com um bloqueador do P2Y₁₂ que não seja impactado por alterações no gene *CYP2C19* (Lee *et al.*, 2022).

Assim como a diretriz da CPIC[®], a Réseau National de Pharmacogénétique Hospitalière (RNPGx) defende o teste farmacogenético e recomenda que a terapia farmacológica dos pacientes metabolizadores lentos e intermediários, seja realizada com um fármaco alternativo (Lamoureux; Duflot, 2017); e a Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) recomenda fortemente que a terapia farmacológica dos pacientes metabolizadores lentos e intermediários seja realizada com um fármaco alternativo ou com a dose duplicada de clopidogrel (150 mg) (PHAMACOGENOMIC RECOMMENDATIONS, FARMACOGENETICA-UPDATE, 2020).

2.4.1 Gene e enzima CYP2C19

O gene *CYP2C19* está relacionado à resposta terapêutica do clopidogrel por codificar a principal enzima CYP2C19 que converte o clopidogrel em sua forma ativa (Malfertheiner; Kandulski; Venerito, 2017). As evidências científicas mostram que alterações no gene *CYP2C19* podem resultar em diferentes respostas ao clopidogrel (Nicolau *et al.*, 2021). Essas alterações genéticas podem ser SNVs, *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), haplótipos, inserções e deleções que comprometem a ação da enzima CYP2C19 e recebem o nome de alelos estrela (*) (Lam, 2018).

Atualmente foram descritas mais de 39 variantes alélicas do gene *CYP2C19*, que permitem classificar a atividade enzimática. A **Tabela 1**, apresenta os alelos estrela mais importantes clinicamente, contendo as SNVs, alelos estrela e a respectiva atividade enzimática (PharmVar, 2024).

Tabela 1 – Relação entre SNVs, alelos estrela do *CYP2C19* e atividade enzimática predita.

SNVs	Alelo estrela	Atividade enzimática
rs3758581	*1	Normal
rs12769205, rs4244285 e rs3758581	*2	Perda de função
rs4986893 e rs3758581	*3	Perda de função
rs12248560 e rs3758581	*17	Aumentada

Fonte: Lee *et al.* (2022), PharmVar (2024).

O alelo estrela de função enzimática normal da *CYP2C19* é o *1. Os alelos com perda de função enzimática mais conhecidos são os alelos *2 e *3. Os alelos de função reduzida são representados pelos alelos *9, *10, *16, *19, *25 e *26. O único alelo de função enzimática aumentada da enzima *CYP2C19* é o *17. E existem alguns alelos cuja atividade enzimática resultante ainda não foi definida: *12, *14, *23, *29, *30, *31, *32, *33, *34 e *39 (Lee *et al.*, 2022).

Uma vez descoberta a composição de alelos estrela de um paciente (diplótipo), é atribuído a esse o fenótipo predito em termos de metabolização do clopidogrel. Segundo a guia do CPIC® para o clopidogrel, os indivíduos podem ser classificados em cinco categorias distintas: lento, intermediário, normal, rápido e ultrarrápido (Lee *et al.*, 2022). A **Tabela 2** apresenta os principais exemplos de diplótipos e respectivos fenótipos metabolizadores preditos.

Tabela 2 – Exemplos de diplótipos do *CYP2C19* e fenótipos preditos correspondentes.

Diplótipos do <i>CYP2C19</i>	Fenótipo predito
*2/*2; *3/*3; *2/*3	Metabolizador lento
*1/*2; *1/*3; *2/*17; *3/*17	Metabolizador intermediário
*1/*1	Metabolizador normal
*1/*17	Metabolizador rápido
*17/*17	Metabolizador ultrarrápido

Fonte: Lee *et al.* (2022).

3 JUSTIFICATIVA

A atualização mais recente (2022) da diretriz do CPIC[®] para o clopidogrel recomenda que os portadores dos alelos *2 e *3 classificados como metabolizadores lentos e intermediários façam preferencialmente o uso de prasugrel ou ticagrelor, antiagregantes plaquetários alternativos para evitar possíveis efeitos adversos (Lee *et al.*, 2022). No entanto, a maior parte dos estudos utilizados para essas recomendações são de populações com ancestralidade europeia e asiática, tendo baixa representatividade latino-americana. Portanto, é necessário verificar a aplicabilidade de tais recomendações na população brasileira.

Vale salientar que a frequência desses alelos varia de acordo com as populações, dois exemplos são os alelos nulos *2 e *3 que são mais frequentes em indivíduos do leste asiático do que outros grupos étnicos; e o *17 que é mais frequente em países da Europa do mediterrâneo-sul do que outras regiões geográficas (Fricke-Galindo *et al.*, 2016). Essas variações alélicas são responsáveis por diferentes implicações clínicas nas populações (Rosemary; Adithan, 2007).

Além do teste genético, a resposta ao clopidogrel pode ser mensurada por meio de um teste com agregômetro, visando quantificar a agregação plaquetária podendo ser medida através de um teste *point-of-care*, que consiste em um teste que pode ser realizado próximo ao paciente e o obtém-se o resultado em poucos minutos (Koltai *et al.*, 2017). Entretanto, apesar deste teste estar sendo reproduzido na literatura, até o momento não existem estudos publicados com agregometria *point-of-care* e genótipos de interesse farmacogenético do clopidogrel realizados no Brasil.

No contexto do serviço de cardiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), existe uma alta demanda de pacientes, principalmente na Unidade Coronária, oriundos de 27 municípios do estado de Minas Gerais (INSTITUCIONAL, 2020). Tais pacientes são atendidos exclusivamente pelo SUS, sendo uma excelente oportunidade para realizar um estudo piloto de farmacogenética do clopidogrel, envolvendo a genotipagem de alelos farmacogenéticos e medida de agregação plaquetária. Após a conclusão do estudo, poderão ser geradas informações para implementação da farmacogenética como ferramenta na tomada de decisões para terapia antiplaquetária dessa população.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Verificar, por meio de um estudo piloto, a viabilidade de implementação de testes de farmacogenética do gene *CYP2C19* em pacientes usuários de clopidogrel no HC-UFTM.

4.2 Objetivos Específicos

- Implementar protocolos de trabalho de bancada pela primeira vez no Laboratório de Genética Humana (LGH) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM);
- Genotipar os alelos *2, *3 e *17 do *CYP2C19* em uma amostra de 146 pacientes usuários do clopidogrel;
- Verificar se há relação dos resultados da genotipagem dos pacientes com o os resultados de agregometria.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos e Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo piloto cujo todos os procedimentos realizados neste projeto de pesquisa foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos da UFTM, sob número 6.233.152, conforme o parecer consubstanciado (**ANEXO A**).

Foi realizado um estudo observacional descritivo, que buscou identificar os pacientes metabolizadores lentos, intermediários, normais, rápidos e ultrarrápidos de clopidogrel, utilizando polimorfismos genéticos e avaliação de agregação plaquetária.

5.2 Amostra do Estudo

Foram convidados 146 pacientes assistidos no serviço de cardiologia do HC-UFTM, por demanda espontânea, que foram submetidos aos procedimentos para ICP, submissão à dose de ataque (48h antes da ICP) e terapia de manutenção medicamentosa com o clopidogrel, alvo deste estudo.

5.2.1 Locais do estudo

As amostras biológicas foram obtidas no serviço de cardiologia do HC-UFTM e transportadas para o LGH na UFTM, onde foram armazenadas e submetidas aos experimentos.

5.2.2 Critérios de inclusão dos voluntários

Critérios de inclusão: pacientes que foram submetidos a angioplastia coronária (colocação de *stent*), e que receberam a prescrição de clopidogrel e com capacidade cognitiva para assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**APÊNDICE A**).

5.2.3 Critérios de exclusão dos voluntários

Critérios de exclusão: pacientes menores de 18 anos de idade; mulheres grávidas; pacientes que precisam fazer o uso de prasugrel ou ticagrelor; e/ou pacientes com alergia ao clopidogrel.

5.3 Experimentos laboratoriais

Todos os experimentos laboratoriais foram executados pelos integrantes do Grupo de Pesquisa em Genética de Populações e Farmacogenética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, que é liderado pela Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares, cujo espelho pode ser encontrado em: dgp.cnpq.br/dgp/espelhorh/4010324301093628.

5.3.1 Coleta e Armazenamento das Amostras Biológicas

Foi coletado até 6,0 mL de sangue venoso periférico, que foi depositado em tubos com *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA) (4,0 mL) para a genotipagem e com citrato (2,0 mL) para o teste de agregometria, etiquetados por código alfanumérico. A coleta para genotipagem foi realizada após a angioplastia. A coleta para avaliação da agregação plaquetária foi realizada em até 48h após a administração da dose de ataque com clopidogrel, administrada antes ou depois do procedimento de angioplastia coronária. A coleta de sangue foi realizada por profissionais de saúde treinados e qualificados.

As amostras biológicas no tubo com EDTA foram armazenadas no freezer a -20°C até a extração do *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). As alíquotas de sangue, assim como o DNA dos pacientes, são armazenados no LGH da UFTM.

5.3.2 Extração, Purificação e Quantificação do DNA Genômico

A extração e purificação do DNA genômico foi realizada a partir de 300 μL do sangue total, usando o kit comercial Puregene[®], da QIAGEN, conforme as instruções do fabricante.

O DNA genômico foi quantificado no fluorímetro digital *Qubit*[™] 2.0, utilizando 1 μL da solução de DNA através do kit de quantificação *Qubit*[™] dsDNA BR Assay Kit, da Thermo Fisher Scientific.

5.3.3 Genotipagem de SNVs do Gene *CYP2C19*

A genotipagem dos SNVs foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real, utilizando as soluções e volumes dispostos no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Soluções e volumes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Solução	Volume/poço
<i>Master Mix (2x)</i>	5,0 µL
<i>TaqMan™ (20x)</i>	0,5 µL
H ₂ O <i>DNase Free</i>	q.s.p.
<i>DNA (15 ng)</i>	1,5 µL
Volume final	10,0 µL

Legenda: q.s.p.: quantidade suficiente para completar.

Fonte: Guia do usuário TaqMan SNP Genotyping Assays (2022).

As SNVs rs4244285 (G>A), rs4986893 (G>A) e rs12248560 (C>T) pertencentes aos alelos *2, *3 e *17 do gene *CYP2C19*, respectivamente, foram genotipados com a tecnologia de sondas *TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assays* no *StepOnePlus™ Real Time PCR System* da *Applied Biosystems*. O **Quadro 2** apresenta o desenho das sondas.

Quadro 2 – Descrição das sondas que foram utilizadas na genotipagem.

Sonda (ID)	Sequência	SNV	Alelo estrela
C__25986767_70	TTCCCACTATCATGATTATTTCCC[A>G] GGAACCCATAACAAATTACTTAAAA	rs4244285	*2
C__27861809_10	ACATCAGGATTGTAAGCACCCCCTG[A>G] ATCCAGGTAAGGCCAAGTTTTTGC	rs4986893	*3
C__469857_10	AAATTTGTGTCTTCTGTTCTCAAAG[C>T] ATCTCTGATGTAAGAGATAATGCGC	rs12248560	*17

Fonte: Thermo Fisher Scientific (2022).

Todas as reações seguiram o protocolo de ciclagem: ativação da Taq DNA Polimerase a 60 °C por 30 segundos (1 ciclo), seguida por 75 ciclos de amplificação (desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60 °C por 1 minuto).

5.3.4 Avaliação da Agregação Plaquetária

A agregação plaquetária foi medida utilizando o equipamento VerifyNow™, de 10 minutos até 4 horas após a realização da coleta. O sangue total em tubo com citrato de 2,0 mL foi acoplado ao cartucho descartável contendo *pellets* revestidos por fibrinogênio e ADP. Posteriormente, o cartucho foi inserido na entrada do dispositivo, para realização da leitura óptica; feita por meio da passagem de luz na coluna de sangue contida no cartucho, na qual o sistema do equipamento converteu as alterações da luminosidade em PRU.

De acordo com os resultados expressos, os pacientes foram classificados como não resistentes ($PRU \leq 208$) ou resistentes ($PRU > 208$) ao tratamento com clopidogrel (Duconge *et al.*, 2021).

5.4 Análises dos Dados

A análise dos dados foi realizada por meio de parâmetros de estatística descritiva. Para representar os dados dos genótipos e fenótipos predito, foram realizados os cálculos de frequência. Os cálculos de frequência alélica foram executados na plataforma R (www.r-project.org). Os gráficos foram elaborados na plataforma Google Colab, por uso da linguagem de programação *Python*, usando os pacotes de gráficos e de análise estatística, *matplotlib* e *statsmodels*, respectivamente. Os gráficos de relação entre genótipos/fenótipos preditos e valores PRU foram plotados utilizando valores de mediana. Os códigos utilizados estão dispostos na plataforma de programação computacional *Github* (<https://github.com/yrohwak>).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Padronização dos Protocolos de Recrutamento de Pacientes

O recrutamento dos pacientes foi realizado de acordo com o seguinte fluxo: ao chegar no hospital devidamente identificado, é realizado o acesso ao setor de hemodinâmica para a verificação do caderno de exames e coleta do registro de cada paciente para visualizar os procedimentos hospitalares através do Aplicativo de Gestão para Hospitais, para localizar o leito onde o paciente se encontra. Nesse momento também são avaliadas as anamneses e evoluções de medicina, enfermagem, nutrição, fisioterapia e odontologia dos pacientes.

Na abordagem ao paciente, primeiro foi realizada a apresentação dos pesquisadores aos indivíduos e explicado de forma didática o que é *stent*, motivo de usar o clopidogrel e que a metabolização do medicamento depende da genética de cada paciente. Também é esclarecido que o acompanhamento é executado durante um ano, dividido em 4 momentos (30 dias, 3 meses, 6 meses e 1 ano) e é fornecido o contato do laboratório e do médico cardiologista. É explicado também que a participação não tem nenhum custo e se dá através da assinatura do TCLE e da doação da amostra de sangue para saber se o medicamento está funcionando. O sangue no tubo com citrato (para teste de agregometria) só pode ser coletado se o paciente possuir dose de ataque com mais de > 48 horas ou realizar o uso contínuo de clopidogrel por mais de 7 dias e sem o uso de inibidores.

O fluxo de recrutamento dos pacientes (**Figura 6**) é iniciado quando os pacientes entram no HC-UFTM e posteriormente é realizado o acesso ao sistema Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários (AGHU) e ao caderno de exames do serviço de hemodinâmica. É observado os critérios de inclusão dos possíveis candidatos ao estudo (se fez angioplastia e uso do clopidogrel). Posteriormente é coletada a identificação e localização dos pacientes para fazer a apresentação e convite para participação da pesquisa. Se o paciente aceitar, por meio da assinatura do TCLE, será verificado os critérios de elegibilidade para realização dos testes de agregometria e genotipagem.

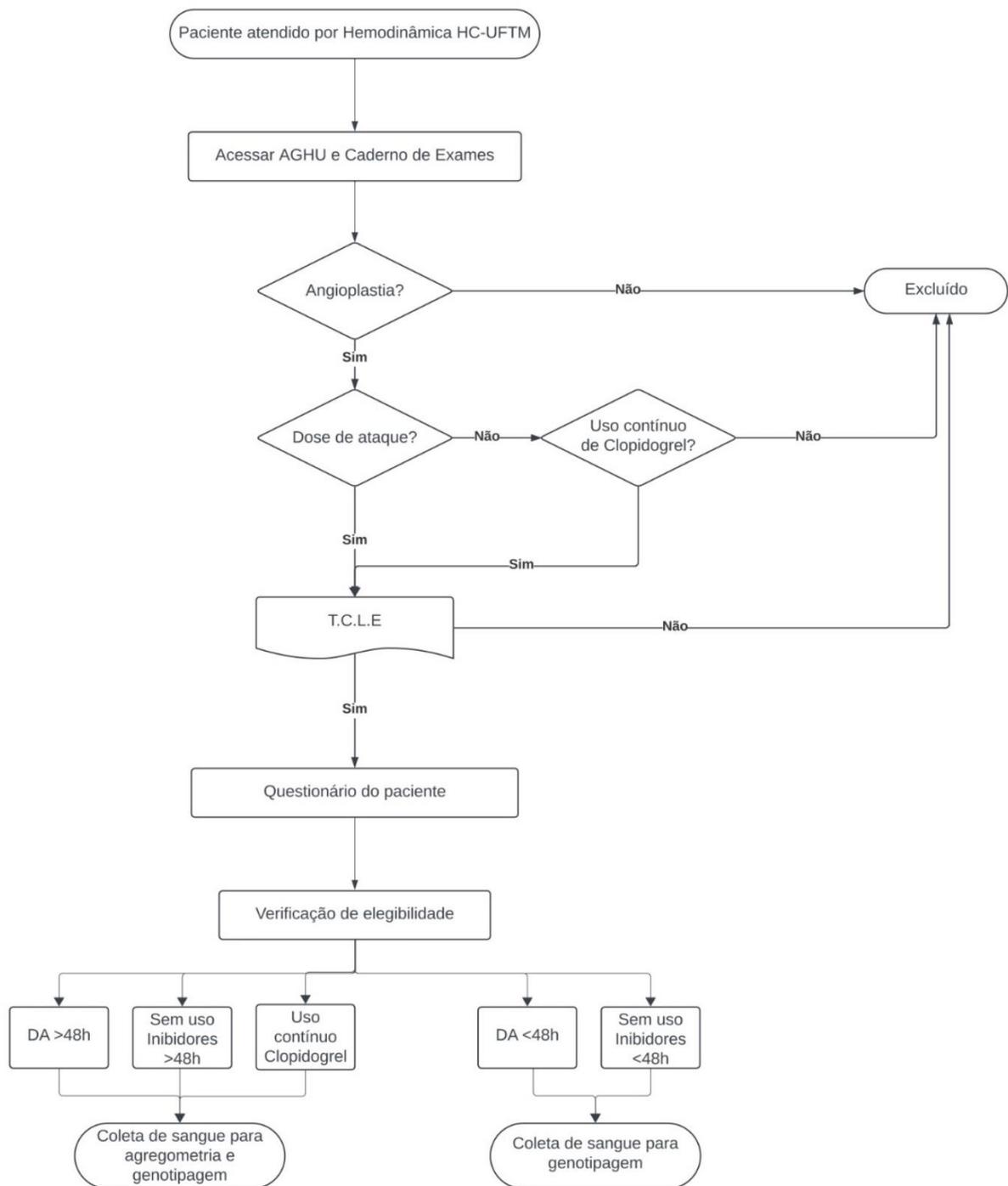


Figura 6 – Fluxograma de recrutamento dos pacientes.

Fonte: Autor (2024).

A padronização do recrutamento dos pacientes se deu após reuniões entre todos os integrantes da pesquisa, estabelecendo planos de ação, etapas do recrutamento, prazos das ações e responsabilidades de cada integrantes. Uma baixa adesão dos voluntários reflete falta de estratégias da equipe de pesquisa, podendo reduzir o número amostral do estudo ou até inviabilizar a execução da pesquisa (Velleca, 2014).

Para o recrutamento é fundamental que os pesquisadores tenham conhecimento e aplique as diretrizes e normas recomendadas pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 466/2012 (Brasil, 2012) estabelece que a confidencialidade e a privacidade devem ser asseguradas.

Dainesi (2004) enfatiza que o recrutamento dos pacientes deve ser realizado de forma clara, balanceada e não coerciva. Tendo o TCLE como um dos documentos, internacionalmente e nacionalmente, mais importantes da pesquisa que envolve seres humanos. O mesmo deve possuir linguagem clara, concisa, apresentar, além das informações sobre a pesquisa, os riscos e os benefícios .

6.2 Padronização da Coleta de Amostras Biológicas

Após a obtenção da assinatura no TCLE, deve ser realizada a higienização das mãos, paramentação com os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), preparação dos materiais, identificação alfanúmerica dos tubos e explicação para o paciente sobre o procedimento que será realizado, posteriormente é localizada a melhor veia para realizar a punção venosa. Garroteando a 15 cm do local, posteriormente é realizada assepsia com algodão e álcool a 70%, em movimentos circulares por três vezes. Posteriormente contacta-se o piloto à agulha de coleta de sangue a vácuo estéril e depois no ângulo de aproximadamente de 35 a 45 °C com o bisel voltado para cima, a pele é perfurada com a agulha e é inserido o tubo no piloto para a coleta, sendo primeiro o tubo com citrato (2 mL) se o paciente for elegível, e depois o tubo com EDTA (4 mL) até as marcações indicadas. Posteriormente, o tubo é retirado do piloto, o garrote é removido do braço paciente, e é usado um algodão sobre a punção e retirada a agulha pressionando o algodão para estancar o sangramento. E depois é colocado um curativo. Todos esses procedimentos podem ser encontrados com mais detalhes no **APÊNDICE B**.

O tubo com EDTA é armazenado em uma caixa refrigerada e transportado para o laboratório, onde deve ser deixado em um freezer a -20° C. Quando houver, o tubo com citrato é deixado em temperatura ambiente até o momento de fazer o teste de agregometria.

Durante a coleta de sangue venoso é fundamental que os profissionais tenham conhecimento e apliquem as medidas de biossegurança para minimizar a exposição aos riscos e possíveis patógenos presentes no ambiente hospitalar, bem como a utilização dos EPIs e descarte correto dos materiais utilizados (Amorim, 2019).

Os exames laboratoriais são divididos em três etapas: pré-analítica, analítica e pós-analítica. O cadastro do paciente, transmissão das instruções de preparo do paciente, coleta,

identificação, armazenamento e transporte compõem a fase pré-analítica. Essa fase é a que exige mais cuidado e atenção, pois 70% dos erros ocorrem nesta fase e comprometem a fase analítica, impossibilitando a execução das análises laboratoriais (Oliveira; Silva, 2022; Santos *et al.*, 2021).

Os erros mais comuns são dados incompletos, procedimento de coleta errados, amostra insuficiente, amostra não identificadas e atraso no transporte ou processamento da amostra. Tais erros podem ser evitados ou minimizados se os profissionais estiverem atentos aos procedimentos, seguindo as recomendações das boas práticas laboratoriais e realizem treinamentos periodicamente (Brasil, 2023; Fleury *et al.*, 2023).

6.3 Padronização dos Protocolos de Bancada

6.3.1 Teste de agregação plaquetária

O teste de agregometria é realizado através do VerifyNow™. O Equipamento deve ser ligado com no mínimo 15 minutos de antecedência para aquecimento. Após esse tempo, é realizado o *Electronic Quality Control* (EQC), posteriormente o paciente é identificado no equipamento e o cartucho e o tubo são inseridos no VerifyNow™ para obter o resultado em PRU. Após o resultado, o cartucho e tubo com sangue são desprezados no lixo infectante. Todos esses procedimentos podem ser encontrados com mais detalhes no **APÊNDICE C**.

O teste de agregometria realizado no VerifyNow™ em comparação com outros (agregometria óptica, plateletwoks, IMPACT-R e PFA-100) é o mais fácil de ser realizado, visto que pode ser realizado com sangue total, sem a manipulação de amostra e com ativação plaquetária *in vitro* (van Werkum *et al.*, 2008).

O método consiste na capacidade das plaquetas ativadas se ligarem ao fibrinogênio: as plaquetas agregam-se nas esferas dentro do cartucho de ensaio revestidas de fibrinogênio, utilizando ADP como agonista e PGE1 como supressor dos níveis de cálcio livre intracelular para diminuir a influência inespecífica da ligação do ADP em proporção ao número de receptores GPIIb/IIIa ativados (Paniccia *et al.*, 2015).

6.3.2 Extração de DNA a partir do sangue total

No Laboratório de Genética Humana (LGH) da UFTM, os primeiros experimentos de bancada foram iniciados com este trabalho, onde foi realizada a padronização do protocolo de extração de DNA utilizando reagentes e soluções (**Quadro 3**) do kit de extração Puregene® da

QIAGEN. Durante esse período foram realizadas instruções de estudantes de iniciação científica e rodízio entre os integrantes do laboratório para treinar o máximo de pessoas possível.

O protocolo utilizado tem 4 etapas principais, conforme a **Figura 7**, na primeira etapa foi feita a lise da membrana citoplasmática; na segunda é purificação dos ácidos nucleicos, onde são removidas as proteínas e outros componentes; a terceira é a precipitação do DNA; e a quarta, a reidratação do DNA. Todos esses procedimentos podem ser encontrados com mais detalhes no **APÊNDICE D**.

A extração de ácidos nucleicos é uma etapa crucial para uso do DNA/*Ribonucleic Acid* (RNA) em técnicas moleculares. É essencial que seja realizada em ambiente livre de contaminantes. Com o advento da tecnologia, houve o desenvolvimento de *kits* de extração que otimizam a técnica e geralmente são divididos em quatro etapas: lise das membranas, extração do DNA, purificação do DNA e reidratação do DNA. A adição de proteinase K faz a digestão de proteínas associadas ao DNA. A concentração, pureza e integridade do DNA dependem da extração (Faria, 2020).



Figura 7 – Principais etapas de extração do DNA a partir do sangue.

Fonte: Autor (2024).

Quadro 3 – Soluções, volumes e funções das soluções utilizadas na padronização do protocolo de extração.

Solução	Para uma amostra	Função
Amostra	300 μ L	Fornecer DNA
<i>RBC Lysis Solution</i>	900 μ L	Lisar os eritrócitos
<i>Cell Lysis Solution</i>	300 μ L	Lisar os leucócitos
Proteinase K	2,5 μ L	Digerir proteínas
<i>Protein Precipitation Solution</i>	100 μ L	Separar proteínas
Isopropanol 100%	300 μ L	Precipitar o DNA
Etanol 70%	300 μ L	Remover a água residual
<i>DNA Hydration Solution</i>	50-60 μ L	Hidratar o DNA

Legenda: *Red Blood Cells*.

Fonte: Puregene® DNA Handbook (2022).

6.3.3 Quantificação de DNA por Qubit™

Os tubos de ensaios Qubit™ foram identificados e foram preparadas: a solução de trabalho em tubo falcon, o padrão 1 e 2 e as amostras. O volume total em cada tubo foi de 200 μL , sendo os tubos padrões, adicionados de 190 μL da solução de trabalho, mais 10 μL de cada padrão; e nos tubos das amostras 199 μL da solução de trabalho mais 1 μL de cada amostra. Todos os procedimentos foram executados conforme a **Figura 8**. Os resultados foram expressos em $\text{ng}/\mu\text{L}$. Todos esses procedimentos podem ser encontrados com mais detalhes no **APÊNDICE E**.

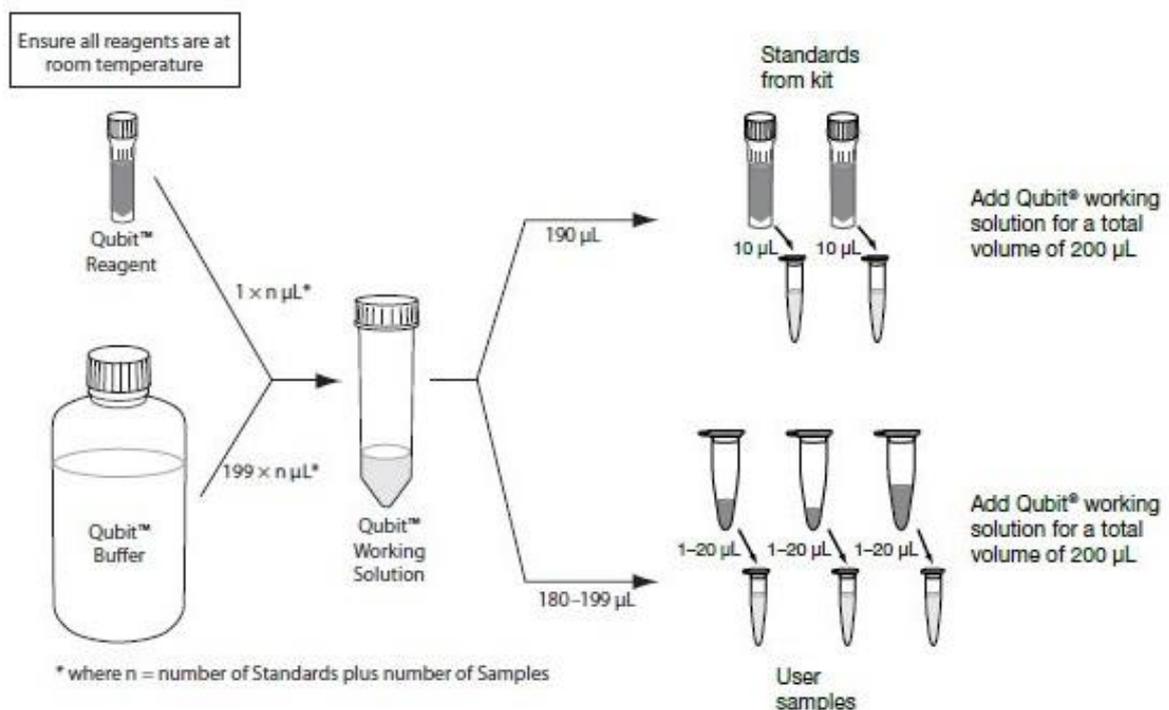


Figura 8 – Esquema de preparação da solução de trabalho, da quantificação dos padrões e das amostras.

Fonte: Veltkamp (2014).

Na genética molecular, o sucesso da etapa conseguinte depende da etapa anterior. Portanto é necessário que após a extração, seja obtida quantidade e qualidade suficiente para o DNA que vai ser analisado. A quantificação por Qubit™ utiliza a fluorimetria emitida por corantes intercalantes de DNA. Dessa forma, quanto maior a intensidade da fluorescência emitida pelo fluoróforo, maior a quantidade de DNA na amostra. Esse método de quantificação apresenta vantagens e desvantagens quando comparado com o método de detecção de absorvância em comprimento de onda específico realizado pelo NanoDrop™ 2000.

Durante o processo de padronização algumas amostras apresentaram valores muito diferentes, quando quantificadas por Qubit™ e por NanoDrop™ 2000. Outros autores também perceberam que amostras quantificadas por NanoDrop™ 2000 parecem ser superestimadas, visto que o equipamento não realiza a quantificação das macromoléculas (proteínas, DNA, RNA) especificamente (Carnevale, 2015; Nakayama *et al.*, 2016). Eles também perceberam que o Qubit™ pode quantificar proteínas, DNA, RNA em baixas concentrações (Masago *et al.*, 2021). O resultado do diagnóstico molecular depende que o DNA seja extraído e quantificado com êxito (Barra *et al.*, 2011).

6.3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A realização da PCR com as condições de ciclagem descritas na metodologia possibilitou o sucesso da amplificação das três sondas referentes aos três alelos estrela do gene *CYP2C19* em uma mesma placa de 96 poços, possibilitando a padronização do trabalho com tais sondas simultaneamente. A (Figura 9) mostra a amplificação de 30 amostras a detecção de três fluoróforos diferentes: FAM (azul), VIC (verde) e ROX (vermelho). O número de 75 ciclos se justifica para a formação do pico da sonda referente ao alelo *17 ser mais lento durante a sua amplificação. Todos esses procedimentos podem ser encontrados com mais detalhes no APÊNDICE F.

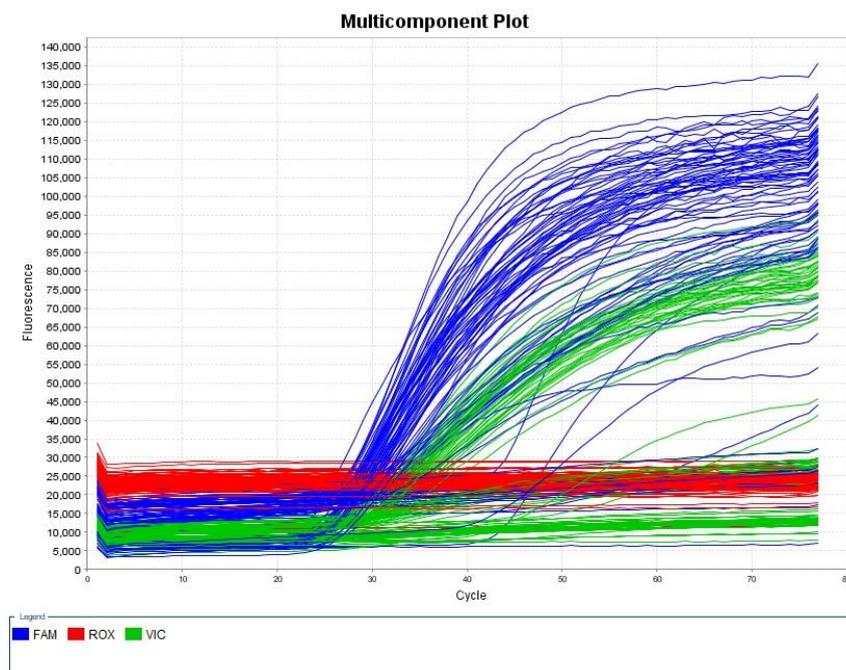


Figura 9 – Representação gráfica de dados de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real do software StepOne v2.2.2.

Fonte: Autor (2024).

A padronização da técnica de PCR para realizar a discriminação alélica é fundamental para estabelecer um protocolo que possibilite a amplificação adequada da região específica da molécula de DNA, bem como o anelamento da sonda *TaqMan*TM para detecção da fluorescência pelo equipamento. Outras técnicas podem ser utilizadas como *microarray* e sequenciamento, mas a genotipagem por PCR em tempo real se apresentou mais rápida que as demais no estudo de Prado (2009).

Durante a padronização pode ser necessário que sejam realizados alguns ajustes de temperatura e ciclagem e que o DNA seja de boa qualidade. Fatores como coleta, extração e armazenamento podem interferir na reação e impedir a discriminação alélica (Cukier *et al.*, 2009).

6.4 Características Demográficas dos Pacientes do Estudo

Dentre os pacientes incluídos nesse estudo, 92 (63,02%) eram do sexo masculino e 54 (36,98%) eram do sexo feminino. A idade média dos pacientes foi de 61,42±10,62 anos de idade. Esses resultados corroboram com outros estudos realizados em pacientes latino-americanos que avaliaram o gene *CYP2C19* e a resposta ao clopidogrel. No estudo de Duconge *et al.*, (2021), o percentual de indivíduos do sexo masculino foi 55,27 e a idade média foi 68 anos. Cedillo-Salazar *et al.* (2019) verificou que 62,7% dos pacientes envolvidos em seu estudo eram do sexo masculino e idade média também era de 68 anos.

Com relação a etnia autodeclarada (**Tabela 3**), a maioria (42,46%) se autodeclararam como pardos, seguindo de brancos (34,25%) e pretos (19,18%). Essa heterogeneidade corrobora com o estudo de Duconge *et al.*, (2021) e difere dos estudos incorporados na CPIC (Lee *et al.*, 2022), cuja maioria se declarou de ascendência europeia. O que faz sentido, pois a América Latina é sub representada pela guia publicada por Lee *et al.* em 2022.

Tabela 3 – Etnia autodeclarada dos pacientes do estudo.

Etnia autodeclarada	n	%
Pardo	62	42,46
Branco	50	34,25
Preto	28	19,18
Não declarado	4	2,74
Amarelo	2	1,37

Fonte: Autor (2024).

6.5 Frequência Genotípica e Inferência de Fenótipo Predito

Neste estudo piloto foi realizada a genotipagem de 146 amostras oriundas de pacientes usuários do serviço de cardiologia do HC-UFTM usuários do clopidogrel em um período de seis meses.

A **Figura 10** apresenta a frequência dos genótipos do gene *CYP2C19* encontrados entre os pacientes incluídos no estudo. Foi verificado que o genótipo mais predominante na amostra estudada foi **1/*1* (46,6%), que são os pacientes que apresentam ausência das variantes estudadas nesse trabalho, seguido por **1/*17* (24,7%) e por **1/*2* (19,9%). Não foram encontrados indivíduos com **3* e não foram encontrados indivíduos com o genótipo **2/*2*. Após o cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi obtido o valor de p de 0,0671, não apresentando nenhuma diferença estatisticamente significativa.

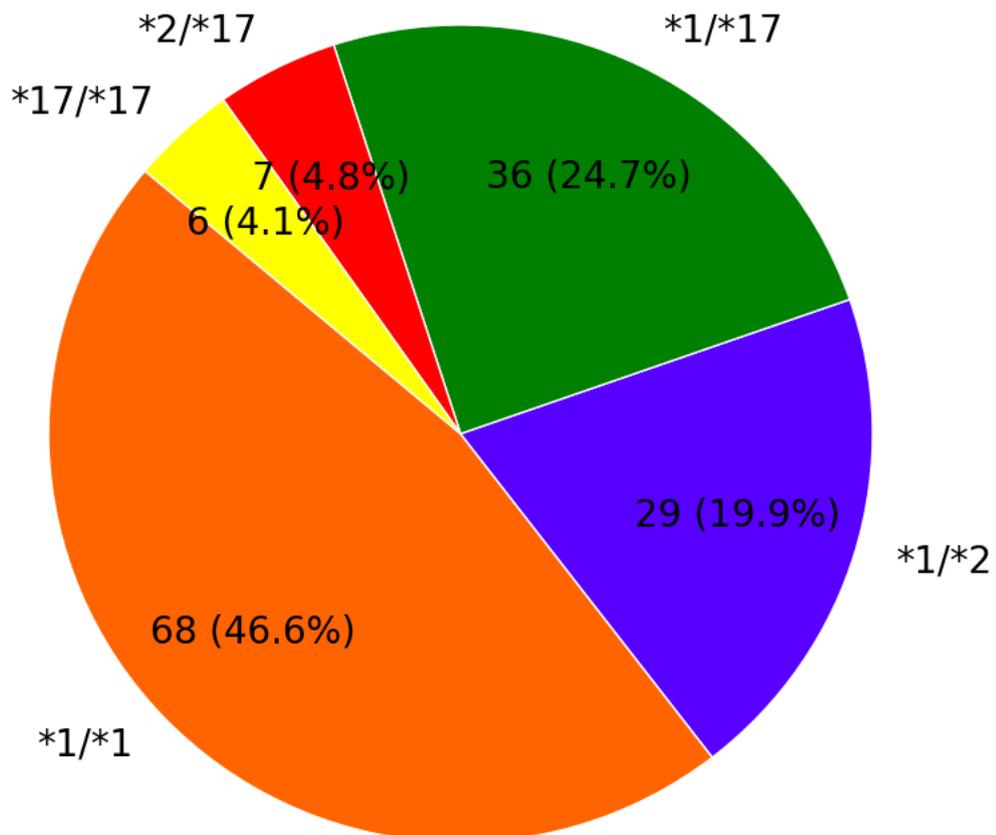


Figura 10 – Frequência dos genótipos de *CYP2C19* dos pacientes usuários do clopidogrel no HC-UFTM.

Fonte: Autor (2024).

A **Figura 11** apresenta a frequência do fenótipo predito de acordo com os genótipos do gene *CYP2C19* investigados. Foi verificado que a maior parte dos indivíduos (46,6%), de acordo com a genética, são preditos como metabolizadores normais, 24,7% são metabolizadores intermediários, 24,7% são metabolizadores rápidos e 4,1% metabolizadores ultrarrápidos. Não foram encontrados indivíduos com fenótipo metabolizador lento.

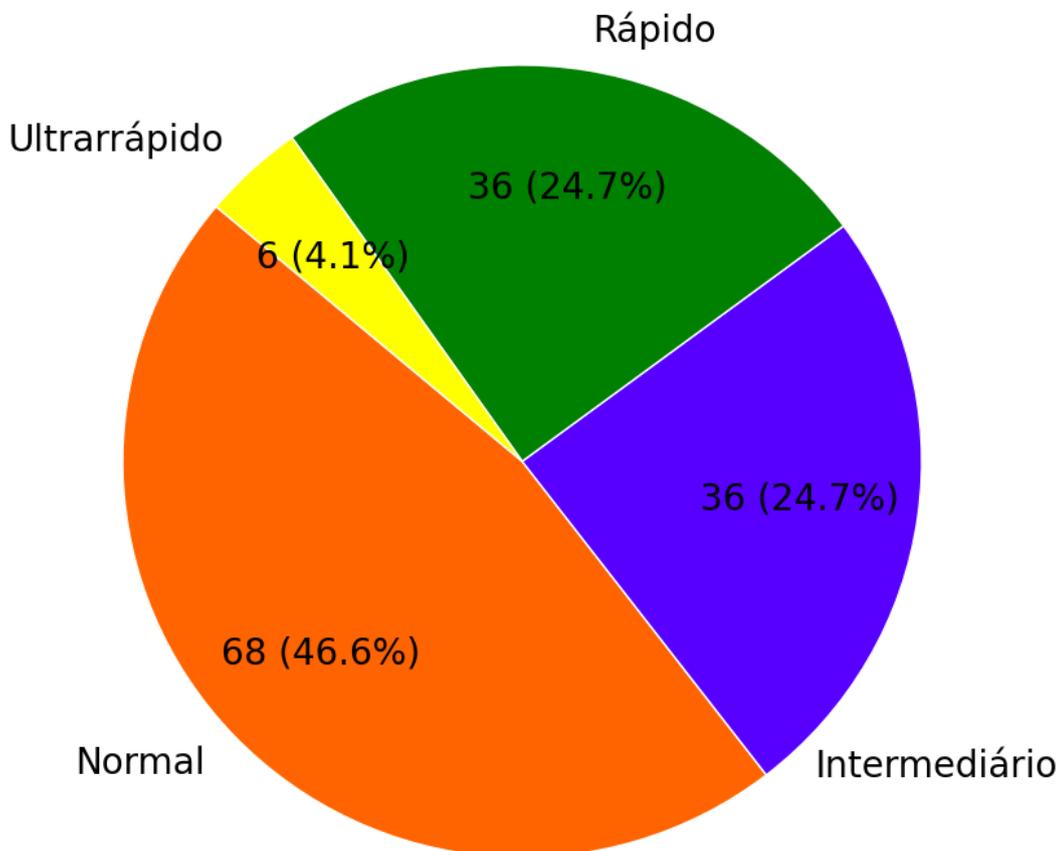


Figura 11 – Frequência dos fenótipos preditos de *CYP2C19* dos pacientes usuários do clopidogrel no HC-UFTM.

Fonte: Autor (2024).

O rs4244285, que representa o *2, trata-se de uma transição (c.681G>A) no éxon 5 que gera um sítio de *splicing* aberrante, ocasionando uma mudança na matriz de leitura do *messenger* RNA (mRNA) e consequentemente produz uma proteína truncada que não vai exercer atividade enzimática (Morais *et al.*, 1994).

A variante rs4986893 representa o *3 define a mutação do tipo transição de uma guanina por uma adenina no códon 636, que produz um códon de parada prematuro no éxon 4 (Xie *et al.*, 2001).

O SNP rs12248560 determina o *17 é uma mutação do tipo transição (-806C>T) na região flanqueadora 5' que causa o aumento da transcrição gênica do *CYP2C19*, que resulta no

aumento da expressão da enzima CYP2C19 e conseqüentemente seu efeito metabolizador em fármacos e pró-fármacos (Sim *et al.*, 2006).

Os indivíduos com genótipo *1/*2 e *2/*17 (metabolizadores intermediários) têm a formação do metabólito ativo do clopidogrel reduzida e a guia da CPIC recomenda que os pacientes com SCA e/ou ICP evitem fazer uso da dose padrão do clopidogrel e façam o uso de prasugrel ou ticagrelor, se não houver contraindicação (Lee *et al.* 2022). Os indivíduos com genótipo *1/*17 (metabolizadores rápidos) têm a formação do metabólito ativo do clopidogrel normal ou aumentada e a guia da CPIC recomenda que os pacientes com SCA e/ou ICP façam uso da dose padrão do clopidogrel (75 mg) (Lee *et al.* 2022). Os indivíduos com genótipo *17/*17 (metabolizadores ultrarrápidos) têm a formação do metabólito ativo do clopidogrel aumentada e a guia da CPIC recomenda que os pacientes com SCA e/ou ICP façam uso da dose padrão do clopidogrel (75 mg) (Lee *et al.* 2022).

Tabela 4 – Recomendações da terapia antiplaquetária baseada no fenótipo predito para pacientes cardiovasculares.

Fenótipo predito	Recomendação terapêutica	Nível de recomendação para pacientes com SCA e/ou ICP
Metabolizador lento	Evitar clopidogrel, se possível. Usar ticagrelor/prasugrel em dose padrão se não houver contraindicação.	Forte
Metabolizador intermediário	Evitar dose padrão de clopidogrel, se possível. Usar ticagrelor/prasugrel em dose padrão se não houver contraindicação.	Forte
Metabolizador normal	Dose padrão de clopidogrel (75 mg/dia)	Forte
Metabolizador rápido	Dose padrão de clopidogrel (75 mg/dia)	Forte
Metabolizador ultrarrápido	Dose padrão de clopidogrel (75 mg/dia)	Forte

Fonte: Lee *et al.*, 2022.

Prasugrel, assim como o clopidogrel, é um antagonista irreversível do receptor plaquetário P2Y₁₂. Trata-se de um pró-fármaco que necessita de uma única ativação hepática, por isso apresenta menor variabilidade na resposta farmacológica. Ticagrelor é um fármaco e por isso não requer ativação, que apresenta efeito rápido ao se ligar reversivelmente ao receptor P2Y₁₂ apresenta meia vida de 7 a 8 horas; como apresenta a ilustração abaixo (**Figura 12**) (Schömig, 2009).

Apesar de prasugrel e ticagrelor apresentarem melhor eficácia clínica, apresentam maior risco de sangramento e possuem custo mais elevado (7 vezes mais) do que o medicamento clopidogrel genérico (Nawarskas; Montoya, 2018).

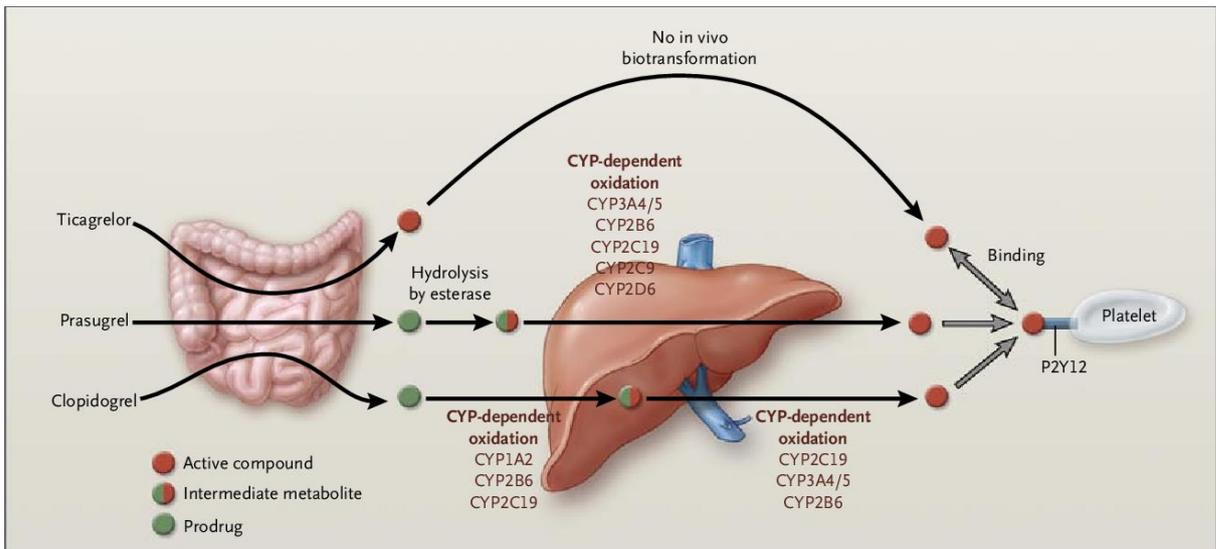


Figura 12 – Esquema de ativação e ação do clopidogrel, prasugrel e ticagrelor.
Fonte: Adaptado de Schömig, 2009.

6.6 Frequência Alélica

A frequência alélica das variantes estudadas encontra-se na **Tabela 5**. Estes resultados corroboram com as frequências já calculadas por uma iniciativa da *Red Iberoamericana de Farmacogenética e Farmacogenômica* para a população brasileira (Rodrigues-Soares *et al.*, 2018) e com as frequências calculadas pelos pesquisadores do Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) (Naslavsky *et al.*, 2022).

Tabela 5 – Frequência alélica dos alelos estrela estudados em comparação com os resultados de Rodrigues-Soares *et al.* (2018) e Naslavsky *et al.* (2022).

Alelo estrela	SNV	Pacientes	Rodrigues-Soares <i>et al.</i> (2018)	Naslavsky <i>et al.</i> (2022)
*2	rs4244285	0,12	0,14	0,15
*3	rs4986893	0,00	0,00	0,00
*17	rs12248560	0,19	0,19	-----

Fonte: Autor (2024); Rodrigues-Soares *et al.* (2018); Naslavsky *et al.* (2022).

É importante enfatizar que a frequência alélica varia de acordo com origem ancestral das populações; no qual o alelo *2 e *3 são mais frequentes em populações asiáticas do que em outras europeias e africanas (Scott *et al.*, 2013).

6.7 Agregação Plaquetária

A **Figura 13** exibe o histograma dos valores de PRU de 51 pacientes incluídos neste teste, com a frequência de indivíduos no eixo vertical e os valores de PRU no eixo horizontal. Foi realizada a avaliação da agregação de 51 pacientes, sendo a maior frequência verificada de 26 pacientes apresentaram o valor de PRU entre 104 a 208, seguida de 10 pacientes que apresentaram valor de PRU entre 52 a 104. O menor valor de PRU encontrado foi de 38 em 1 paciente e o maior de 324 em 1 paciente. 14 (25,5%) pacientes foram considerados resistentes (PRU > 208) e 37 (74,5%) não resistentes (PRU < 208) (**Figura 8**).

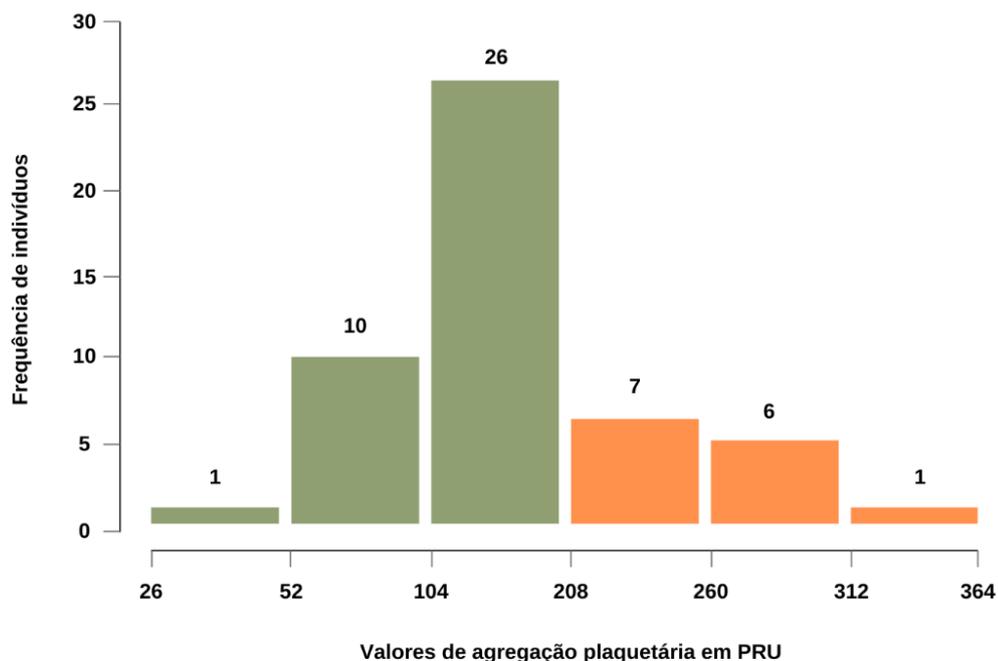


Figura 13 – Distribuição dos indivíduos por valores de agregometria em PRU.

Fonte: Autor (2024).

Um trabalho que teve o objetivo de analisar a influência do *CYP2C19**2 na resistência ao clopidogrel em 94 usuários, do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre, que faziam uso da dose padrão (75 mg/dia) na média dos valores de agregação plaquetária em PRU; verificou que os pacientes com *CYP2C19**2 (heterozigoto ou homozigoto) apresentavam média de PRU > 230 (Todeschini; Bandinelli, 2015).

Duconge *et al.* (2021) realizou um trabalho com diversos farmacogenes envolvidos com a resposta ao clopidogrel em 474 pacientes hispânicos caribenhos, no qual detectaram que 33,5% dos pacientes eram resistentes ao clopidogrel (PRU > 208). Desse percentual de indivíduos resistentes, cerca de 7% possuíam o alelo *2 (rs4244285).

Um estudo com a farmacogenética do clopidogrel realizado com pacientes de Porto Rico detectou associação do *CYP2C19**2 (rs4244285) com a alta reatividade plaquetária. A reatividade plaquetária média encontrada no estudo foi de 203 ± 61 (Hernández-Suárez *et al.*, 2018).

Um trabalho realizado com 102 pacientes do Nordeste do México investigou a associação do *CYP2C19**2 (rs4244285) com resistência ao clopidogrel (PRU > 235) e encontrou associação do *CYP2C19**2 em metabolizadores lentos com a resistência ao clopidogrel (Cedillo-Salazar *et al.*, 2019).

O estudo de Lee *et al.*, (2009) realizou uma verificação da relação de 7 polimorfismos genéticos em pacientes coreanos resistentes ao clopidogrel após implantação de *stent*. Eles detectaram que 112 (28,9%) eram resistentes. Destes pacientes resistentes, o alelo *3 se apresentou mais prevalente do que no grupo não resistente.

Vale salientar que os pesquisadores consideram diferentes valores para classificar a responsividade plaquetária (Malinin *et al.*, 2006; Tantry *et al.*, 2013). Sendo que o valor de PRU >208 foi associado com um risco aproximadamente 3 vezes maior de trombose de *stent* e infarto do miocárdio, morte vascular, infarto do miocárdio ou AVE no estudo *Assessment of Dual AntiPlatelet Therapy with Drug-Eluting Stents* (ADAPT-DES) (Stone *et al.*, 2013); corroborando com os resultados obtidos no estudo *Gauging Responsiveness With a VerifyNow Assay-Impact on Thrombosis and Safety* (GRAVITAS), que associou valores de PRU <208 com resultados clínicos melhores (Price *et al.*, 2011).

6.8 Relação Genótipo X Agregometria (PRU)

A **Figura 14** apresenta a distribuição dos valores de PRU entre os grupos de genótipos. Observa-se que para a maioria dos genótipos avaliados apresentam valores de PRU abaixo de 208, com exceção do genótipo *2/*17.

Em relação ao genótipo *2/*17, o *2 cria *splicing* aberrante que produz uma proteína truncada não funcional, e o *17 atua em região regulatória aumentando a atividade transcricional. Apesar dos alelos apresentarem esses efeitos opostos, quando eles ocorrem juntos a ativação do clopidogrel observada é baixa, sugerindo que o *2 é o principal determinante na metabolização do clopidogrel (Lewis *et al.*, 2013).

É importante salientar que novas variantes precisam ser descobertas em populações latino-americanas, que apresentam um cenário genético único, que podem prever a alta reatividade plaquetária durante a terapia com o clopidogrel (Yang *et al.*, 2023a).

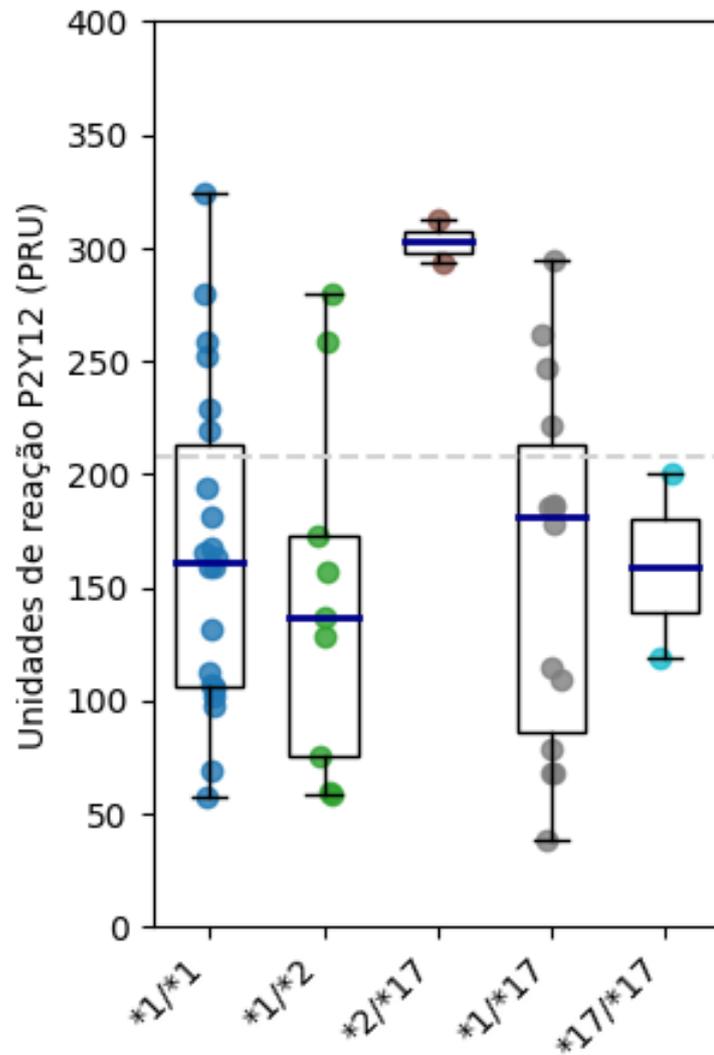


Figura 14 – Representação gráfica dos valores de agregometria (PRU) distribuídos por genótipos.

Fonte: Autor (2024).

6.9 Relação Fenótipo Predito X Agregometria (PRU)

Na **Figura 15** verifica-se que todos os valores de PRU ficaram abaixo de 208, incluindo os valores centrais (medianas). Não se observa uma relação clara entre os fenótipos preditos e os valores de PRU dos pacientes, pois os pacientes metabolizadores intermediários apresentaram valores abaixo de 208 PRU, da mesma forma que pacientes metabolizadores rápidos apresentaram valores acima de 208.

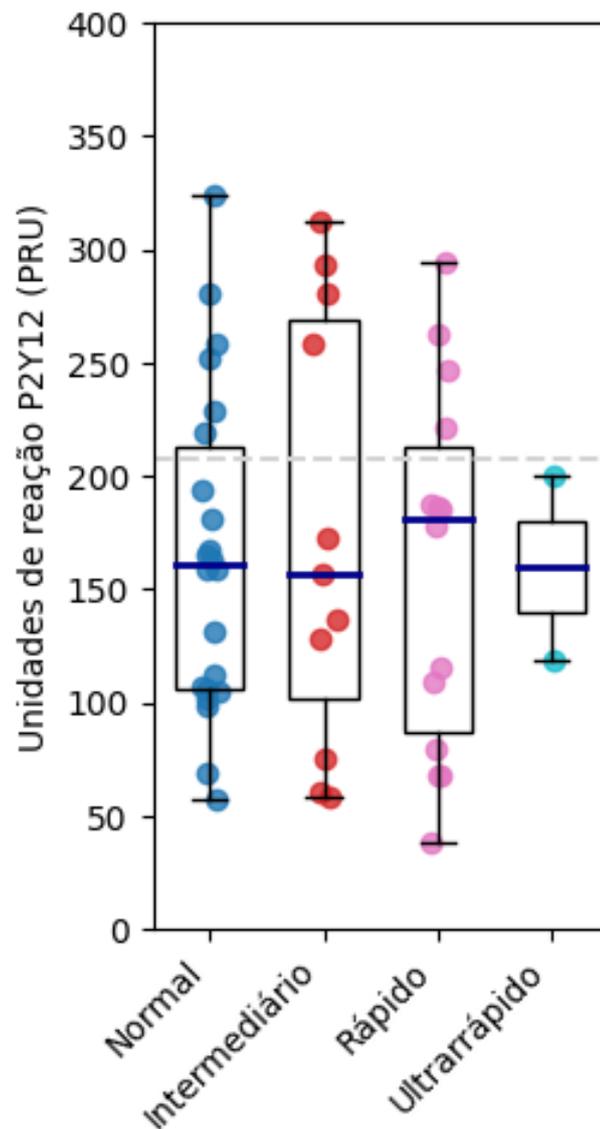


Figura 15 – Representação gráfica dos valores de agregometria (PRU) distribuídos por fenótipos preditos.

Fonte: Autor (2024).

Estudos de associação de genótipos e desfecho farmacológico também não encontraram esta associação em populações não europeias; necessitando verificar se outra interferência genética pode estar influenciando na resposta ao clopidogrel em outras populações, incluindo a brasileira (Verma *et al.*, 2020). Um estudo com 167 afro-americanos encontrou associação dos genes *IRS-1*, *ABCB1* e *KDR* com os valores de PRU (Yang *et al.*, 2023b). Sugere-se confrontar esses resultados com informações demográficas, epidemiológicas e clínicas, para verificar a interferência desses fatores a estes resultados obtidos (Marchini *et al.*, 2017).

7 CONCLUSÕES

Com base nos achados desse estudo piloto, é viável a execução de um estudo farmacogenético para investigar polimorfismos no gene *CYP2C19* de interesse farmacogenético em usuários de clopidogrel no HC-UFTM, bem como iniciar o projeto de pesquisa sem ter nenhum trabalho do mesmo tipo realizado anteriormente no laboratório ou na instituição, implementando toda a logística de recrutamento de pacientes, coleta de amostras biológicas, extração de DNA, genotipagem por PCR e agregometria.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo piloto, dentre as SNVs do *CYP2C19* investigados, as variantes mais prevalentes foram *17 e *2, respectivamente. Não foi encontrada uma relação dos resultados de agregometria com os marcadores farmacogenéticos investigados.

Vale salientar que estes resultados são preliminares e podem mudar com o aumento do número de indivíduos. Mas até o momento, não se alinham com guia publicada pela CPIC® em 2022. Portanto, faz-se necessário ampliar a população envolvida neste estudo para aumentar as evidências de desfecho da correlação dos marcadores genéticos com a resposta ao clopidogrel.

8 PERSPECTIVAS

Espera-se que o número de pacientes aumente ao longo da execução desta pesquisa para aumentar as evidências farmacogenéticas sobre o gene *CYP2C19* em pacientes usuários do clopidogrel na população brasileira.

Devido ao tempo, não foi possível analisar as informações demográficas, epidemiológicas e clínicas, mas o estudo continuará sendo desenvolvido e aprimorado no HC-UFTM e no HC-UFMG. Com isso, os próximos passos serão:

- Acompanhamento dos pacientes em até um ano após a data da coleta;
- Criação de um roteiro para implementação da farmacogenética no serviço de cardiologia do HC-UFTM;
- Replicação desta pesquisa no HC-UFMG em Belo Horizonte;
- Replicação desta pesquisa em outras cidades do Brasil;
- Envio dos resultados para a Secretaria de Saúde Estadual de Minas Gerais e para o Ministério da Saúde;
- Envio de relatório para a Sociedade Brasileira de Cardiologia para contribuir com as diretrizes de uso de antiplaquetários;
- Verificação da aplicabilidade da “*CPIC® Guideline for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2022 Update*” na população brasileira.

REFERÊNCIAS

Al-Azzam, S. I. *et al.* Factors that contribute to clopidogrel resistance in cardiovascular disease patients: environmental and genetic approach. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 51, n. 3, p. 179-186, mar. 2013. DOI: <https://doi.org/10.5414/cp201784>.

Ali, Z. O. *et al.* Effect of CYP2C19 genetic variants on bleeding and major adverse cardiovascular events in a cohort of Arab patients undergoing percutaneous coronary intervention and stent implantation. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 32, n. 5, p. 183-191, July 2022. DOI: <https://doi.org/10.1097/fpc.0000000000000469>.

Almandoz, J. D. *et al.* Variability in initial response to standard clopidogrel therapy, delayed conversion to clopidogrel hyper-response, and associated thromboembolic and hemorrhagic complications in patients undergoing endovascular treatment of unruptured cerebral aneurysms. **Journal of NeuroInterventional Surgery**, v. 6, n. 10, p. 767-773, dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2013-010976>.

Amorim, F. D. **Situações que configuram risco de exposição a material biológico em recepção e sala de coleta de sangue em laboratórios de análises clínicas: um estudo observacional**. 2019. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Higiene Ocupacional) – Instituto Federal da Paraíba, Patos, 2019.

Armstrong, A. W.; Golan, D. E. Farmacologia da hemostasia e trombose. 2014. *In*: Golan, D. E. *et al.* **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. Eed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

Badimon, L.; Vilahur, G. Mecanismos de acción de los diferentes agentes antiplaquetarios. **Revista Española de Cardiología Suplementos**, v. 13, n. B, p. 8-15, enero 2013. DOI: [10.1016/S1131-3587\(13\)70074-8](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(13)70074-8).

Barra, G. B. *et al.* Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 3, 254-260, 2011.

Barros e Silva, P. G. M. *et al.* Avaliação do seguimento de um ano dos pacientes incluídos no Registro Brasileiro de Síndromes Coronárias Agudas (ACCEPT). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, n. 6, p. 995-1003, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20190879>.

Bhatt, D. L. *et al.* ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use: a report of the American College of Cardiology Foundation task force on Clinical Expert Consensus Documents. **Circulation**, v. 118, n. 18, p. 1894-1909, oct. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191087>.

Biswas, M. *et al.* Risk of major adverse cardiovascular events of CYP2C19 loss-of-function genotype guided prasugrel/ticagrelor vs clopidogrel therapy for acute coronary syndrome patients undergoing percutaneous coronary intervention: a meta-analysis. **Platelets**, v. 32, n. 5, p. 591-600, July 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1792871>.

Brandt, J. T. *et al.* Common polymorphisms of *CYP2C19* and *CYP2C9* affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 12, p. 2429-2436, dec. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02775.x>.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/renome/20210367-renome-2022_final.pdf>.

Brasil. Ministério Nacional da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília, DF. **Diário Oficial [da] União**. (2012).

Carlquist, J. F. *et al.* Cardiovascular risk among patients on clopidogrel anti-platelet therapy after placement of drug-eluting stents is modified by genetic variants in both the *CYP2C19* and *ABCB1* genes. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 109, n. 4, p. 744-754, apr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1160/TH12-05-0336>.

Carnevale, G. G. **Análise de interferentes na extração, amplificação e detecção de M. tuberculosis por reação de PCR em amostras de líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar**. 2015. 81 f. Tese (Doutorado em Pneumologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5150/tde-12012016-090128/publico/GabrielaGasparCarnevale.pdf>>.

Cavallari, L. H.; Momary, K. M. Pharmacogenetics in cardiovascular diseases. *In*: Lam, Y. W. F.; Scott, S. R. (Ed.). **Pharmacogenomics: challenges and opportunities in therapeutic implementation**. 2. ed. London: Academic Press, 2018. p. 133-179.

Cedillo-Salazar, F. R. *et al.* Association of *CYP2C19**2 polymorphism with clopidogrel resistance among patients with high cardiovascular risk in Northeastern Mexico. **Archivos de Cardiología de México**, v. 89, n. 4, p. 324-329, 2019. DOI: <https://doi.org/10.24875/ACM.19000033>.

Cheema, A. N. *et al.* Characterization of clopidogrel hypersensitivity reactions and management with oral steroids without clopidogrel discontinuation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 27;58, n. 14, p. 1445-1454, sept. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.06.040>.

Claassens, D. M. F. *et al.* A genotype-guided strategy for oral P2Y₁₂ inhibitors in primary PCI. **The New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 17, p. 1621-1631, oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1907096>.

Collet, J. P. *et al.* Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. **Lancet (London, England)**, v. 373, n. 9660, p. 309-317, jan. 2009. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61845-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61845-0).

Cukier, H. N. *et al.* Sample degradation leads to false-positive copy number variation calls in multiplex real-time polymerase chain reaction assays. **Analytical Biochemistry**, v. 386, n. 2, p. 288-290, mar. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.11.040>.

Dainesi, S. M. Como melhorar o recrutamento de pacientes em estudos clínicos? **Revista da Associação de Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, p. 241, set. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302004000300017>.

Demertzis, S.; Cassina, T.; Casso, G. Antiplatelet therapy before cardiac surgery. **The Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 19, n. 4, p. 110-116, apr. 2016.

Duconge, J. *et al.* Pharmacogenomic polygenic risk score for clopidogrel responsiveness among Caribbean Hispanics: a candidate gene approach. **Clinical and Translational Science**, v. 14, n. 6, p. 2254-2266, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/cts.13124>.

Egges, L. K.; Araújo, M. C. A terapêutica anticoagulante. **Disciplinarum Scientia**, v. 16, n. 2, p. 275-295, 2015. DOI: <https://doi.org/10.37777/1019>.

Falcão, F. J. A. *et al.* P2Y₁₂ Platelet Receptors: importance in percutaneous coronary intervention. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 3, p. 277-282, set. 2013. DOI: <https://doi.org/10.5935/abc.20130162>.

Faria, V. C. S. **Avaliação de dois métodos de extração de DNA em amostras obtidas por swab associados às técnicas moleculares de PCR convencional, PCR em tempo real e LAMP para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar**. 2020. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

Feres, F. *et al.* Diretriz da sociedade brasileira de cardiologia e da sociedade brasileira de hemodinâmica e cardiologia intervencionista sobre intervenção coronária percutânea. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 1-81, jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.5935/abc.20170111>.

Ferreira, C. N. *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000500016>.

Fleury *et al.* **Manual de coleta em laboratório clínico**. 4. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2023.

Frere, C. *et al.* Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 8, p. 1088-1093, apr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.11.065>.

Fricke-Galindo, I. *et al.* Interethnic variation of CYP2C19 alleles, ‘predicted’ phenotypes and ‘measured’ metabolic phenotypes across world populations. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 16, n. 2, p. 113-123, apr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.70>.

Garg, R.; Uretsky, B. F.; Lev, E. I. Anti-platelet and anti-thrombotic approaches in patients undergoing percutaneous coronary intervention. **Catheterization and Cardiovascular Interventions**, v. 70, n. 3, p. 388-406, sept. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/ccd.21204>.

Gaspard, K. J. Alterações na Hemostasia. In: ____ **Fisiopatologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 250-260.

Geisler, T. *et al.* CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 9, p. 1251-1259, sept. 2008. DOI: <https://doi.org/10.2217/14622416.9.9.1251>.

Gelbenegger, G; Jilma, G. Clinical pharmacology of antiplatelet drugs. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 15, n. 10, p. 1177-1197, oct. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/17512433.2022.2121702>.

Hernández-Suárez, D. F. *et al.* Pharmacogenetic association study on clopidogrel response in Puerto Rican hispanics with cardiovascular disease: a novel characterization of a Caribbean population. **Pharmacogenomics Personalized Medicine**, v. 11, p. 95-106, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2147%2FPGPM.S165805>.

Hirsh, J.; Bhatt, D. L. Comparative benefits of clopidogrel and aspirin in high-risk patient populations: lessons from the CAPRIE and CURE studies. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 19, p. 2106-2110, oct. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1001/archinte.164.19.2106>.

Hoffbrand, A. V; Moss, P. A. H; Pettit, J. E. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. In: ____ **Fundamentos em hemostasia**. 5. ed, Porto Alegre: Editora Artmed, 2008. p. 274-288.

Hulot, J. S. *et al.* CYP2C19 but not PONI genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. **Circulation. Cardiovascular Interventions**, v. 4, n. 5, p. 422-428, oct. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.111.963025>.

INSTITUCIONAL. **Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares**. [online]. 30 set. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sudeste/hc-uftm/aceso-a-informacao/institucional>>. Acesso em: 18 jul. 2022.

Jacobson, A. K. Platelet ADP receptor antagonists: ticlopidine and clopidogrel. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 17, n. 1, p. 55-64, mar. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.beha.2004.03.002>.

Jiang, M.; You, J. H. Review of pharmacoeconomic evaluation of genotype-guided antiplatelet therapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 5, p. 771-779, apr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1013028>.

Koltai, K. *et al.* Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1803, aug. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fijms18081803>.

Korolkovas, A. **Dicionário terapêutico guanabara**. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.

Kuszynski, D. S.; Lauver, D. A. Pleiotropic effects of clopidogrel. **Purinergic Signalling**, v. 18, n. 3, p. 253-265, sept. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007%2Fs11302-022-09876-0>.

Lam, Y. W. F. Principles of Pharmacogenomics: pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical implications. *In*: LAM, Y. W. F.; Scott, S. R. (Ed.). **Pharmacogenomics: challenges and opportunities in therapeutic implementation**. 2. ed. London: Academic Press, 2018. p. 1-53.

Lamoureux, F.; Dufлот, T. Pharmacogenetics in cardiovascular diseases: state of the art and implementation-recommendations of the French National Network of Pharmacogenetics (RNPGx). **Therapies**, v. 72, n. 2, p. 257-267, apr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.therap.2016.09.017>.

Lee, C. R. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for *CYP2C19* Genotype and Clopidogrel Therapy: 2022 update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 5, p. 959-967, nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpt.2526>.

Lee, J. M. *et al.* Relation of genetic polymorphisms in the cytochrome P450 gene with clopidogrel resistance after drug-eluting stent implantation in koreans. **The American Journal of Cardiology**, v. 104, n. 1, p. 46-51, july 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.02.045>.

Lewis, J. P. *et al.* The *CYP2C19**17 variant is not independently associated with clopidogrel response. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 11, n. 9, p. 1640-1646, sept. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111%2Fjth.12342>.

Libby, P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 21, p. 2004-2013, may 2013. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1216063>.

Lomakin, N. *et al.* Cost-effectiveness of platelet function-guided strategy with clopidogrel or ticagrelor. **European Cardiology Review**, v. 14, n. 3, p. 175-178, dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.15420%2Fecr.2018.29.2>.

Longo, D. L. *et al.* **Medicina Interna de Harrison**. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 1796-1796.

Lüllman, H. *et al.* **Color atlas of pharmacology**. 3. ed., rev and expanded. New York: Thieme, 2017.

Mackie, I. J.; Pitillo, R. M. Vascular integrity and platelet function. **International Anesthesiology Clinics**, v. 23, n. 2, p. 3-21, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1097/00004311-198523020-00003>.

Magee, R. F. *et al.* Síndrome Coronariana Aguda: uma revisão. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 1, n. 3, p. 174-189, 2012. Disponível em: <<https://portalrevistas.ucb.br/index.php/rmsbr/article/view/3591/2219>>.

- Majerus, P. W.; Tollefsen, D. M. Anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários. *In: Hardman, J. LIMBIRD, L. (Ed.). Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica.* 10. Ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. 1141-1155.
- Malakar, A. K. *et al.* A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 16812-16823, aug. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.28350>.
- Malek, L. A. *et al.* Coexisting polymorphisms of P2Y12 and CYP2C19 genes as a risk factor for persistente platelet activation with clopidogrel. **Circulation Journal**, v. 72, n. 7, p. 1165-1169, July 2008. DOI: <https://doi.org/10.1253/circj.72.1165>.
- Malfertheiner, P.; Kandulski, A.; Venerito, M. Proton-pump inhibitors: understanding the complications and risks. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 697-710, sept. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcph.769>.
- Malinin, A. *et al.* Validation of a VerifyNow-P2Y12[®] cartridge for monitoring platelet inhibition with clopidogrel. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 315-322, June 2006. DOI: <https://doi.org/10.1358/mf.2006.28.5.990205>.
- Marchini, J. F. M. *et al.* Decreased platelet responsiveness to clopidogrel correlates with CYP2C19 and PON1 polymorphisms in atherosclerotic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 1, p. e5660, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165660>.
- Masago, K. *et al.* Comparison between fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of DNA and RNA extracted from frozen and ffpe tissues from lung cancer patients: a real-world use of genomic tests. **Medicina (Kaunas)**, v. 57, n. 12, p. 1375, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fmedicina57121375>.
- Morais, S. M. *et al.* The major genetic defect. Responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 22, p. 15419-15422, June 1994. DOI: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)40694-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)40694-6/pdf).
- Nakayama, Y. *et al.* Pitfalls of DNA quantification using DNA-binding fluorescent dyes and suggested solutions. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0150528, Mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150528>.
- Nascimento, B. R. *et al.* Epidemiologia das doenças cardiovasculares em países de língua portuguesa: dados do “Global Burden of Disease”, 1990-2016. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 6, p. 500-511, June 2018. DOI: <https://doi.org/10.5935/abc.20180098>.
- Naslavsky, M. S. *et al.* Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1004, Mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28648-3>.
- Nawarskas, J. J.; Montoya, T. N. Switching from ticagrelor or prasugrel to clopidogrel. **Cardiology in Review**, v. 26, n. 2, p. 107-111, Mar./Apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1097/CRD.000000000000181>.

Nicolau, J. C. *et al.* Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST – 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, n. 1, p. 181-264, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20210180>.

Niu, X. *et al.* *CYP2C19* polymorphism and clinical outcomes among patients of different races treated with clopidogrel: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 35, n. 2, p. 147-156, apr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1404-7>.

Oliveira, R. G. A. M.; Silva, G. A. F. Os principais erros da fase pré-analítica de exames laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.202202089>.

Paniccia, R. *et al.* Platelet function tests: a comparative review. **Vascular Health and Risk Management**, v. 11, p. 133-148, feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.2147%2FVHRM.S44469>.

Parmacogene Variation Consortium - PharmVar. [online]. 2024. Disponível em: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C19>. Acesso em: 10 maio 2024.

Pereira, N. L. *et al.* Clopidogrel Pharmacogenetics: state-of-the-art review and the TAILOR-PCI study. **Circulation: Cardiovascular Interventions**, v. 12, n. 4, p. e007811, apr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1161%2FCIRCINTERVENTIONS.119.007811>.

Pereira, N. L. *et al.* Effect of genotype-guided oral P2Y12 inhibitor selection vs conventional clopidogrel therapy on ischemic outcomes after percutaneous coronary intervention: the TAILOR-PCI randomized clinical trial. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 761-771, aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12443>.

Periayah, M. H. *et al.* Glycoprotein IIb/IIIa and P2Y12 induction by oligochitosan accelerates platelet aggregation. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, p. 653149, aug. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/653149>.

PHAMACOGENOMIC RECOMMENDATIONS, FARMACOGENETICA-UPDATE. [online]. 2020. Dutch Pharmacogenomic Working Group – DPWG. Disponível em: <http://www.knmp.nl/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

PHARMGKB. [online]. 2020. Disponível em: <https://www.pharmgkb.org/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

Prado, C. M. **Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes *CYP2C6*, *CYP2C19* e *CYP2C9*: aplicação na farmacogenética**. 2009. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Price, M. J. *et al.* Platelet reactivity and cardiovascular outcomes after percutaneous coronary intervention: a time-dependent analysis of the Gaugin Responsiveness with a VerifyNow P2Y12 assay: Impact on Thrombosis and Safety (GRAVITAS) trial. **Circulation**, v. 124, n.

10, p. 1132-1137, sept. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.029165>.

Relling, M.; Klein, T. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 89, n. 3, p. 464-467, mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.279>.

Rocha, B.; Aguiar, C. Síndrome coronária aguda em mulheres idosas: a inflamação ataca novamente. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, n. 3, p. 515-517, maio/jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.36660%2Fabc.20200092>.

Rodrigues-Soares, F. *et al.* Genetic structure of pharmacogenetic biomarkers in Brazil inferred from a systematic review and population-based cohorts: a RIBEF/EPIGEN-Brazil initiative. **The Pharmacogenomics Journal**, v.18, n. 6, p. 749-759, dec. 2018.

Rosemary, J.; Adithan, C. The Pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: ethnic variation and clinical significance. **Current Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 93-109, jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.2174/157488407779422302>.

Ruggeri, Z. M. Platelets in atherothrombosis. **Nature Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1227-1234, nov. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1102-1227>.

Sangkuhl, K.; Klein, T. E.; Altman, R. B. Clopidogrel pathway. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 20, n. 7, p. 463-465, july 2010. DOI: <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283385420>.

Sangkuhl, K. *et al.* Platelet aggregation pathway. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 8, p. 516-521, aug. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283406323>.

Santos, P. R. *et al.* Impacto nos custos por erros pré-analíticos em laboratórios de análises clínicas. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicinal e Laboratorial**, v. 57, p. 1-4, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210023>.

Savi, P. *et al.* Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 84, n. 5, p. 891-896, nov. 2000.

Savi, P. *et al.* The active metabolite of clopidogrel disrupts P2Y12 oligomers and partitions the out of lipids rafts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 29, p. 11069-11074, july 2006. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0510446103>.

Schafer, A. I. Antiplatelet therapy. **American Journal of Medicine**, v. 101, n. 2, p. 199-209, aug. 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(96\)80077-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(96)80077-5).

Schilling, U., Dingemans, J.; Ufer, M. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Approved and Investigational Receptor P2Y12 Antagonists. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 59, n. 5, p. 545-566, may 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00864-4>.

Schömig, A. Ticagrelor – is there need for a new player in the antiplatelet-therapy field? **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 11, p. 1108-1111, sept. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejme0906549>.

Scott, S. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) Genotype and Clopidogrel Therapy. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, n. 2, p. 328-332, aug. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.132>.

Scott, S. A. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 update. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 94, n. 3, p. 317-323, sept. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.105>.

Shahabi P, Dubé MP. Cardiovascular pharmacogenomics; state of current knowledge and implementation in practice. **International Journal of Cardiology**, v. 184, p. 772-795, apr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.02.025>.

Silverthorn, D. U. *et al.* Sangue. In: ___ **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 5. ed, Porto Alegre: Editora Artmed, 2011. p. 547-567.

Sim, S. C. *et al.* A common novel *CYP2C19* gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, n. 1, p. 103-113, jan. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2005.10.002>.

Söderberg, M.; Holm, M.; Gupta, A. Assessment of platelet function after discontinuation of ticagrelor. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 64, n. 4, p. 526-531, apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/aas.13524>.

Sorich, M. J. *et al.* *CYP2C19* genotype has a greater effect on adverse cardiovascular outcomes following percutaneous coronary intervention and in Asian populations treated with clopidogrel: a meta-analysis. **Circulation Cardiovascular Genetics**, v. 7, n. 6, p. 895-902, dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000669>.

Stein, R. *et al.* Farmacogenômica e doença cardiovascular: onde estamos e para onde vamos? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 4, p. 690-700, 2020. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20200151>.

Stone, G. W. *et al.* Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicentre registry study. **Lancet**, v. 382, n. 9892, p. 614-623, aug. 2013. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61170-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61170-8).

Tantry, U. S. *et al.* Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 24, p. 2261-2273, dec. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.07.101>.

Teich, V.; Araujo, D. V. Estimativa de custo da síndrome coronariana aguda no Brasil. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 24, n. 2, p. 85-94, mar./abr. 2011. Disponível em: http://sociedades.cardiol.br/socerj/revista/2011_02/a_2011_v24_n02_02estimativa.pdf.

Todeschini, C. C.; Bandinelli, E. Estudo sobre a influência do polimorfismo *CYP2C19*2* na agregação plaquetária de pacientes em terapia com clopidogrel. In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, XXVII, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

van Werkum, J. W. *et al.* The use of the VerifyNow system to monitor antiplatelet therapy: a review of the current evidence. **Platelets**, v. 19, n. 7, p. 479-488, nov. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537100802317918>.

Varon, D.; Spectre, G. Antiplatelet agents. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2009, n. 1, p. 267-272, jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.267>.

Wayne, C.; Gruel, Y.; Pouplard, C. Hemostasia: fisiología y principales pruebas de exploración. **EMC-Tratado de Medicina**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(21\)44685-4](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(21)44685-4).

Velleca, M. S. T. Estratégias de recrutamento de participantes para pesquisa clínica: aspectos importantes e desafios. In: Congresso Internacional Sabará de Especialidade Pediátricas, 2º... **Anais...** v. 4, n. 1, 2014. Disponível em: <https://pdf.blucher.com.br/medicalproceedings/2cisep/022.pdf>.

Veltkamp, H. W. **A plug based micro solid phase extraction (μ SPE) microfluidic chip for the isolation and purification of DNA**. 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Twente, Enschede, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.2673.5761>.

Verma, S. S. *et al.* Genomewide association study of platelet reactivity and cardiovascular response in patients treated with clopidogrel: a study by the international clopidogrel pharmacogenomics consortium. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 108, n. 5, p. 1067-1077, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpt.1911>.

Xi, Z. *et al.* *CYP2C19* genotype and adverse cardiovascular outcomes after stent implantation in clopidogrel-treated Asian populations: a systematic review and meta-analysis. **Platelets**, v. 30, n. 2, p. 229-240, dec. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1413178>.

Xie, H. G. *et al.* Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 815-850, apr. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.815>.

Yamaguchi, Y. *et al.* Effects of VerifyNow P2Y12 test and *CYP2C19*2* testing on clinical outcomes of patients with cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. **Platelets**, v. 24, n. 5, p. 352-361, July 2012. DOI: <https://doi.org/10.3109/09537104.2012.700969>.

Yang, C. *et al.* Discovery of ancestry-specific variants associated with clopidogrel response among Caribbean Hispanics. **medRxiv**, oct. 2023a. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.09.29.23296372>.

Yang, C. *et al.* The role of global and local ancestry on clopidogrel response in African Americans. **Pacific Symposium on Biocomputing 2023**, v. 28, p. 221-232, jan. 2023b.

Zehnder, J. L. Fármacos usados nos distúrbios da coagulação. *In*: Katzung, B. G.; Trevor, A. J. *Farmacologia básica e clínica*. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017. p. 584-601.

Zhang, H. Z. *et al.* *CYP2C19* but not *CYP2B6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *PON1* or *P2Y12* genetic polymorphism impacts antiplatelet response after clopidogrel in koreans. **Blood Coagulation & Fibrinolysis: a international jornal in haemostasis and thrombosis**, v. 28, n. 1, p. 56-61, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000536>.

Zhang, Y. J. *et al.* Influence of genetic polymorphisms in *P2Y12* receptor signaling pathway on antiplatelet response to clopidogrel in coronary heart disease. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 22, n. 1, p. 575, dec. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12872-022-02988-w>.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Nós, Dra. Fernanda Rodrigues Soares, Dr. Eduardo Tarazona Santos, pesquisadores da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), estamos convidando você a participar de um estudo chamado “**Farmacogenética Cardiovascular e Ancestralidade no Brasil**”.

Nesta pesquisa estamos tentando entender como variações genéticas influenciam na forma como o nosso organismo transforma os medicamentos que nós usamos para tratar diversas doenças. No mesmo tratamento, algumas pessoas podem ter mais efeitos colaterais, enquanto outras pessoas podem não ter nenhuma melhora com o uso dos medicamentos. Podemos ver se você se enquadra em algum desses casos antes de você tomar o medicamento. Com esse objetivo, estamos convidando a participar deste estudo pacientes que usam o medicamento clopidogrel. Se você aceitar participar, faremos seu acompanhamento médico e coletaremos sangue e dados de seu prontuário médico para olhar se suas variações genéticas e características do sangue que podem levar você a ter mais efeitos colaterais que outras pessoas.

Para tanto você deverá comparecer na unidade de saúde (HC-UFTM ou HC-UFMG) para a coleta de amostra de sangue por aproximadamente 30 minutos. Não é necessário estar em jejum. Você poderá sentir alguma dor pela coleta de amostra de sangue na veia do braço. Mas qualquer dor deve durar apenas alguns instantes. Todos os procedimentos são realizados com esterilização adequada, portanto o risco de infecção no local de inserção da agulha é extremamente baixo. A amostra de sangue colhida é pequena e não representa risco à sua saúde. Os benefícios esperados com essa pesquisa são a previsão de efeitos colaterais e/ou ausência de melhora em pacientes usando o clopidogrel. Além disso, vamos também aumentar as evidências sobre a frequência de pessoas com predisposição a sofrer efeitos colaterais ou não terem melhora com o clopidogrel no Brasil. Dessa forma, saberemos se a nossa população tem muitas ou poucas pessoas que precisam desse teste. Portanto, você estará contribuindo para o conhecimento do efeito da genética na transformação que os medicamentos têm no nosso organismo.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e retirar o seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu atendimento, tratamento ou acompanhamento no Hospital das Clínicas. A identificação das amostras de sangue será feita por códigos para evitar que as pessoas tenham informação sobre seus exames. Apenas os pesquisadores poderão ter essa informação. Em nenhum momento você será identificado, mesmo quando os resultados do estudo forem divulgados. Você não gastará nem ganhará dinheiro por participar da pesquisa.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo. Se você tiver algum dano decorrente deste projeto, você terá direito à indenização. Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores para que eles possam tirar sua dúvida. Você poderá também fazer contato com a Dra. Fernanda Rodrigues Soares, responsável pelo projeto, na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 17 horas, na Rua Vigário Carlos, 100, Bairro Abadia) ou pelo telefone (34) 3700-6434 ou com o Dr. Eduardo Tarazona Santos, na Universidade Federal de Minas Gerais (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 17 horas, na Av. Antônio Carlos, 6627, ICB-L3-258) ou pelo telefone (31) 3409-2572.

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) também poderá prestar esclarecimentos ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Uberaba (8:00-12:00 e 13:00-17; Avenida Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões, Bairro Abadia) ou pelo telefone (34) 3700-6803.

Se você autorizar, seu sangue coletado poderá ser armazenado para pesquisas futuras. Estudos futuros poderão esclarecer se você possui alta ou baixa probabilidade de ter efeitos colaterais com a utilização de outros medicamentos como analgésicos, antidepressivos, anticoagulantes e quimioterápicos. Caso você concorde com o armazenamento, você será informado sobre o resultado dessas pesquisas futuras e poderá se beneficiar em outros tipos de tratamentos. Você pode excluir a autorização de armazenamento da sua amostra a qualquer momento, sem nenhum prejuízo. A amostra de seu sangue ficará armazenada na UFTM ou UFMG em condições apropriadas para estudos futuros.

Este Termo de Consentimento foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Eu entendi o que me foi explicado e aceito participar da pesquisa.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou dos riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão. Fui informado que serei atendido sem custos. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do participante da pesquisa)

_____(cidade), _____ de _____ de _____.

Também fui informado de que há interesse em se guardar o material biológico coletado para estudos futuros e entendi as razões para isso, de forma que:

- () Autorizo a guarda do material.
() Não autorizo a guarda do material.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo para a participação neste estudo.

(Assinatura do Pesquisador)

_____(cidade), _____ de _____ de _____.

APÊNDICE B – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DA COLETA DE SANGUE

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM
Laboratório de Diversidade Genética Humana

PROCOLO DE COLETA DE SANGUE A VÁCUO

Protocolo original:**Escrito e adaptado por:** Karwhory Wallas**Responsável:** Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares**Data:** Novembro/2023**Materiais necessários:**

1. Utensílios: agulha, adaptador para coleta a vácuo, tubos de coleta, suporte para tubos de coleta, algodão, curativo, caneta e papel toalha.
2. Álcool 70º INMP.
3. Equipamentos de Proteção Individual: Luvas, máscara, touca, óculos, jaleco.

Antes de começar a coleta:

1. Lavar as mãos com água e sabão.
2. Calçar as luvas.
3. Selecionar e identificar o(s) tubo(s).
4. Com algodão embebido em álcool 70º INMP, limpe o garrote (se não for descartável).
5. Separe todo material que vai ser utilizado: agulha, adaptador para coleta a vácuo, algodão, curativo.
6. Abra a tampa branca da agulha (lado que encaixa no tubo) e conecte no adaptador para coleta a vácuo.

Procedimento:

1. Peça para o voluntário sentar-se na cadeira e posicione o braço d'ele inclinado para baixo.
2. Garrotei firmemente o braço do voluntário e peça-o para abrir e fechar as mãos até encontrar a veia. Faça isso para visualizar e sentir melhor a veia para puncionar.
3. Peça ao voluntário para manter as mãos fechadas até puncionar.
4. Realize a desinfecção do local onde será realizada a coleta com álcool 70º INPM.
5. Desrosquei a tampa que cobre a agulha.
6. Estenda a pele do paciente e realize a punção da veia. Introduza até a metade da agulha no ângulo de 30º.

7. Encaixe o tubo no adaptador para coleta a vácuo e visualize o sangue fluir.
8. Quando o sangue começar a fluir no tubo, remova o garrote do braço do voluntário e peça para ele abrir/relaxar a mão.
9. Quando o sangue preencher a capacidade do tubo, remova o tubo do adaptador para coleta a vácuo e inverta o tubo para homogeneizar de 5 a 8 vezes.
10. Posicione (SEM PRESSIONAR) o algodão SEM ÁLCOOL no braço do voluntário, onde está sendo realizada a coleta.
11. Remova a agulha da veia do voluntário e depois pressione o algodão SEM ÁLCOOL no local onde foi realizada a coleta. Logo em seguida, peça para o paciente segurar o algodão pressionando até estancar o sangue. Evitar dobrar o braço.
OBS.: Caso ainda permaneça saindo sangue no local da coleta, oriente o paciente para elevar o braço e com o auxílio de um algodão pressione o local.
12. Cole um curativo no local onde foi realizada a punção.
13. Libere o voluntário.

Após a coleta:

1. Desconecte a agulha do adaptador para coleta a vácuo.
OBS.: NUNCA reencape as agulhas com as mãos. Utilize pinças removedoras de agulhas.
2. Descarte a agulha no recipiente adequado para perfurocortantes.

APÊNDICE C – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO TESTE DE AGREGOMETRIA

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM
Laboratório de Genética Humana - LGH

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA
VerifyNow Ver Handbook: VerifyNow - Manual do usuário
Escrito e adaptado por: Karwhory Wallas Responsável: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares Data: Janeiro/2024

Amostras de sangue total:

Amostras coletadas em tubos específicos contendo citrato e com capacidade de 2 mL, podem ser usadas em até 4 horas após a coleta.

Materiais necessários:

1. Equipamentos de Proteção Individual (máscara, luvas, óculos de proteção e jaleco).
2. Equipamento: VerifyNow.
3. 1 cartucho para cada teste/amostra.
4. Tubo azul de 2 mL com amostra de sangue. Obs.: Realizar o teste entre 10 min a 4 h após a coleta. Não colocar o tubo com sangue no gelo (armazenar e transportar em temperatura ambiente).

Ao ligar o equipamento, a primeira vez do dia fazer o EQC todo dia (uma vez por dia)

1. Ligar o equipamento usando o interruptor que fica na parte traseira. Aguardar a mensagem ser exibida “sistema está aquecendo”. E aguardar essa mensagem sumir.
2. Aguardar o equipamento aquecer por 15 minutos antes de iniciar o teste.
3. Apertar na primeira tecla ao lado direito da tela.
4. Clique na tecla correspondente ao Controle de Qualidade (QC - terceiro desenho).
5. Remova o EQC do compartimento de armazenamento no lado direito do equipamento. Obs.: segure o cartucho no local de apoio.
6. Abra a tampa do equipamento e insira o EQC até ouvir um clique. O equipamento vai emitir dois bipes sonoros.
7. Fechar a tampa de entrada de teste. A tela irá exibir uma contagem regressiva enquanto está processando o EQC.
8. Quando o controle de qualidade eletrônico for concluído, o instrumento pedirá ao usuário que ele remova completamente o dispositivo de EQC da entrada de teste.
9. Abra a tampa e remova o EQC e coloque-o de volta no compartimento de armazenamento no lado direito do equipamento.
10. Fechar a tampa de entrada de teste.
11. Aguardar a tela exibir o resultado.
12. Registre o resultado - “PASS” ou “FAIL” (APÊNDICE I).
13. Apertar na primeira tecla ao lado direito da tela para retornar ao menu principal.

Teste de avaliação da agregação plaquetária:

1. Ligar o equipamento usando o interruptor que fica na parte traseira. E aguardar a tela inicial ser exibida.
2. Clique na tecla correspondente ao teste (primeira tecla/desenho). Digite a ID do paciente. E aperte na primeira tecla ao lado direito. A tela vai solicitar, que insira o cartucho no equipamento
3. Abra o pacote de alumínio do cartucho. Segure o cartucho no local de apoio. Remova a tampa da agulha girando no sentido horário e puxando.
4. Abra a tampa do equipamento e insira o cartucho no equipamento até ouvir dois cliques. Obs.: Se o cartucho for de um lote novo, use o leitor de código de barras para ler o código de barras na embalagem do cartucho.
5. Agite o tubo que está com a amostra de sangue 5x delicadamente para misturar os reagentes antes do teste.
6. Quando a tela solicitar a inserção do tubo. Insira o tubo encaixando no poço do cartucho. Quando o tubo estiver completamente encaixado, o equipamento vai emitir dois bipes sonoros.
7. Fechar a tampa de entrada do teste em 2 segundos.
8. Aguardar de 3 a 5 minutos o equipamento processar a amostra e exibir o resultado em PRU na tela.
9. Registrar os resultados.
10. Se for iniciar um novo teste, aperte na primeira tecla ao lado direito da tela para retornar ao menu principal.

Após o realizar o teste:

1. Abra a tampa e remova o cartucho com o tubo juntos. ATENÇÃO: não separar o cartucho do tubo.
2. Feche a tampa de entrada do teste.
3. Descarte o cartucho com o tubo juntos no lixo de material biológico.
4. Desligar o equipamento usando o interruptor que fica na parte traseira.
5. Não deixe vestígios.

APÊNDICE D – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DO SANGUE TOTAL

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM
Laboratório de Genética Humana - LGH

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL
Kit Puregene DNA Ver Handbook: HB-0326-004 HB Puregene DNA 0122 WW.pdf
Protocolo original: Protocolo Extracao de DNA - GENTRA - Sangue total - Projeto Minas .pdf Escrito e adaptado por: Karwhory Wallas Responsável: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares Data: Janeiro/2024

Amostras de sangue total:

Amostras coletadas em EDTA, citrato, ou heparina podem ser usadas frescas ou congeladas.

Amostras podem ser estocadas a curto ou longo prazo.

- a) para armazenamento a curto prazo, colete o sangue em tubos contendo EDTA como anticoagulante e armazene os tubos em temperatura ambiente (15-25 °C) por 1 dia ou 4 °C por até 5 dias
- b) para armazenamento a longo prazo, colete o sangue em tubos contendo algum anticoagulante (preferencialmente EDTA quando DNA de alto peso molecular for de interesse) e armazene-os a -80 °C.

Materiais necessários:

1. Equipamentos de Proteção Individual (máscara, luvas, touca, óculos de proteção e jaleco).
2. Pipetas e ponteiras (10, 200 e 1000 µL).
3. Equipamentos: (vortex e 2 banhos-maria).
4. Descarte de ponteiras, descarte para amostras biológicas (com hipoclorito) e descartex.
5. Caneta para identificação dos tubos.
6. 3 Tubos de 1,5 mL por amostra.
7. 4 tubos falcon de 15 mL.
8. 2 tubos de 2 mL.
9. Racks: para os tubos *ependorf*, para os tubos falcons e para flutuar no banho-maria.
10. Caixa de isopor com gelo.
11. Amostras. Obs.: Quando o sangue não tiver plasma visível, mesmo depois de muito tempo parado, significa que está hemolisado e as chances da extração falhar são altas.

Solução	Para uma amostra (µL)	Para ____ amostras
Amostra	300 µL	300 µL

<i>RBC Lysis Solution</i>	900 µL	
<i>Cell Lysis Solution</i>	300 µL	
Proteinase K	2,5 µL	
<i>Protein Precipitation Solution</i>	100 µL	
Isopropanol 100%	300 µL	
Etanol 70%	300 µL	
<i>DNA Hydration Solution</i>	50-60 µL	

Antes de começar a extração:

1. Ligue os banhos-maria a 37 e 57 °C.
2. Pegue gelo na caixa de isopor.
3. Limpe a bancada com hipoclorito e com Etanol 70%.
4. Separe e identifique os tubos p/ cada amostra (são três p/ cada).
5. Aliquote todos os reagentes citados na tabela acima.
6. Coloque o *Isopropanol 100%* no freezer.
7. Adicione água sanitária no frasco de descarte.
8. Identificar os tubos que serão utilizados.

Extração:

1. **Adicione** 900 µL de *RBC Lysis Solution* em um tubo de 1,5 mL.
2. **Homogenize** as amostras de sangue **invertendo** o tubo coletor várias vezes até que não sejam observadas fases.
3. **Transfira** 300 µL de sangue total para o tubo de 1,5 mL, **homogeneizando** 5 vezes com a pipeta.
4. **Incube** por 1 min a temperatura ambiente (15 - 25 °C). **Inverta** o tubo pelo menos uma vez durante a incubação. Para sangue fresco (coletado há 1h antes do início da extração) aumente o tempo de incubação para 3 min para garantir a lise completa das células vermelhas.
5. **Inverta** o tubo 40 vezes antes da centrifugação.
6. **Centrifugue** por 1 min a 13000 rpm para precipitar as células brancas. Obs.: Na centrifuga, coloque a dobradiça do tubo para cima, para indicar o lado que estará o *pellet* após a centrifugação.
7. **Descarte** cuidadosamente o sobrenadante no descarte com hipoclorito, deixando aproximadamente 10 µL do líquido residual e o *pellet*.
8. **Vortexe** vigorosamente os tubos (no máximo 2 tubos por vez) para ressuspender o *pellet* no líquido residual (o *pellet* deve desaparecer completamente após vortexar). Não é estritamente necessário vortexar após retirar (com a pipeta) o sobrenadante da solução.

9. **Adicione** 900 μL de *RBC Lysis Solution* em um tubo de 1,5 mL, **homogeneizando** 5 vezes com a pipeta.
10. **Incube** por 1 min a temperatura ambiente (15 - 25 $^{\circ}\text{C}$). **Inverta** o tubo pelo menos uma vez durante a incubação. Para sangue fresco (coletado há 1h antes do início da extração) aumente o tempo de incubação para 3 min para garantir a lise completa das células vermelhas.
11. **Inverta** o tubo 40 vezes antes da centrifugação.
12. **Centrifugue** por 1 min a 13000 rpm para precipitar as células brancas. Obs.: Na centrífuga, coloque a dobradiça do tubo para cima, para indicar o lado que estará o *pellet* após a centrifugação.
13. **Descarte** cuidadosamente o sobrenadante no descarte com hipoclorito, deixando aproximadamente 10 μL do líquido residual e o *pellet*.
14. **Vortexe** vigorosamente os tubos (no máximo 2 tubos por vez) para ressuspender o *pellet* no líquido residual (o *pellet* deve desaparecer completamente após vortexar). Não é estritamente necessário vortexar após retirar (com a pipeta) o sobrenadante da solução.
Obs.: Em casos de amostras com células coaguladas, ou seja, com pellet vermelho, repetir o processo do início por até 3 vezes, caso a lise não tenha sido eficiente.
15. **Adicione** 300 μL de *Cell Lysis Solution* e **pipete repetitivamente** para lisar as células **ou vortexe** vigorosamente por 10s.
16. **Incube** por 3 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ no banho-maria até que a solução fique homogênea.
ATENÇÃO: As amostras são estáveis em Solução de Lise Celular por pelo menos 2 anos a temperatura ambiente.
17. **Dê um spin** em todas as amostras, utilizando a centrífuga.
18. **Adicione** 2,5 μL de *Proteinase K* (kit) no tubo de 1,5 mL.
19. **Vortexe** os tubos de 1,5 mL com as amostras.
20. **Dê spin** nos tubos de 1,5 mL com as amostras.
21. **Incube** a 57 $^{\circ}\text{C}$ no banho-maria por no mínimo 2h ou *overnight* no banho-maria. **Vortexe** o tubo algumas vezes durante o intervalo de incubação.
ATENÇÃO: Após o *overnight*, as amostras podem ser congeladas.
22. Ao tirar da incubação, **coloque brevemente no gelo**.
23. Em seguida, **vortexe** os tubos de 1,5 mL com as amostras.
24. **Adicione** 100 μL da *Protein Precipitation Solution*.
25. **Vortexe** vigorosamente por 20s a alta velocidade.
26. **Incube** os tubos de 1,5 mL por 1 min no gelo.
27. **Centrifugue** por 3 min a 13000 rpm. O precipitado de proteínas deve formar um *pellet* marrom escuro firme.

28. **Incube** os tubos de 1,5 mL por 5 min no gelo.
29. **Repita a centrifugação** (3 min a 13000 rpm).
30. Após a centrifugação, **transfira** o sobrenadante para um novo tubo limpo. **Certifique-se de que o pellet de proteína não seja pipetado**. E **descarte** o tubo com o *pellet* de proteína marrom escuro firme.
31. **Repita a centrifugação** (3 min, velocidade máxima) para que toda a proteína seja eliminada da amostra.
32. **Adicione** 300 µL de *Isopropanol 100%* em outro tubo limpo de 1,5 mL.
33. **Adicione** o sobrenadante do passo 30, despejando cuidadosamente no tubo com *Isopropanol 100%* (tubo do passo anterior - 32) e **homogeneizando com a pipeta**. **Certifique-se de que o pellet de proteína não seja pipetado**. **Imediatamente inverta gentilmente** o tubo 50 vezes até que o DNA seja visível. **Descarte** o tubo com o *pellet* de proteína marrom escuro firme.
ATENÇÃO: A extração pode ser pausada após a adição do *Isopropanol 100%*.
34. **Centrifugue** por 3 min a 13000 rpm. O DNA será visível como um pequeno *pellet* branco.
35. **Descarte** cuidadosamente o sobrenadante e **vire o tubo** sobre um papel absorvente. Cuidado para que o *pellet* permaneça no tubo.
36. **Adicione** 300 µL de *Etanol 70%*.
37. **Inverta** os tubos várias vezes para lavar o pellet.
38. **Centrifugue** por 1 min a 13000 rpm.
39. **Descarte** cuidadosamente o sobrenadante e **vire o tubo** sobre um papel absorvente limpo. Retire o máximo de *Etanol 70%* com a pipeta. Cuidado para que o *pellet* permaneça no tubo.
40. **Deixe** o *Etanol 70%* evaporar por 5 minutos.
Obs.: Evitar secar muito o pellet, para não ficar difícil de dissolver.
41. **Adicione** 30 µL de *DNA Hydration Solution* (20 µL nas amostras com pouco *pellet* de DNA).
42. **Vortexe** os tubos por 5 segundos em velocidade média.
43. **Incube** a 37°C no banho-maria por 10 min para dissolver o DNA.
44. **Armazene** o DNA extraído a -20 ou -80 °C.

Após o término da extração:

1. Quantifique o DNA da amostra (consultar protocolo de quantificação [NanoDrop](#) ou [Qubit](#)).
2. Transfira o DNA para um tubo de tampa de rosca devidamente identificado e congele a amostra.
3. Limpe a centrífuga, pipetas, bancada, suporte para tubos e banho-maria.
4. Remova touca, máscara, luvas e lave as mãos.
5. Não deixe vestígios.

APÊNDICE E – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE DNA

**Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM
Laboratório de Genética Humana - LGH**

PROTOCOLO QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO POR QUBIT 2.0
Equipamento Qubit 2.0 Fluorometer Ver manual: https://drive.google.com/file/d/1u1CtStgt1pSUXSqEnmmJSWIXcoBOaxWr/view?usp=drive_link
Feito por: Karwhory Wallas Responsável: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares Data: Abril/2024

Materiais necessários para a quantificação:

1. Pipeta e ponteira de 10 µL, 200 µL e 1000 µL;
2. Soluções: Soluções padrão 1 e 2, reagente Qubit, buffer Qubit;
3. 2 tubos Qubit para soluções padrão e para a quantidade de amostras a serem quantificadas.
4. *Racks* para os tubos;
5. Descarte para ponteiras.

Antes da quantificação:

Cálculos para fazer a solução de trabalho:

Quadro para cálculos da solução de trabalho.

	1 reação (uL)	____ reações (uL)
Reagente Qubit	1	
Buffer Qubit	199	

Preparo das soluções de trabalho:

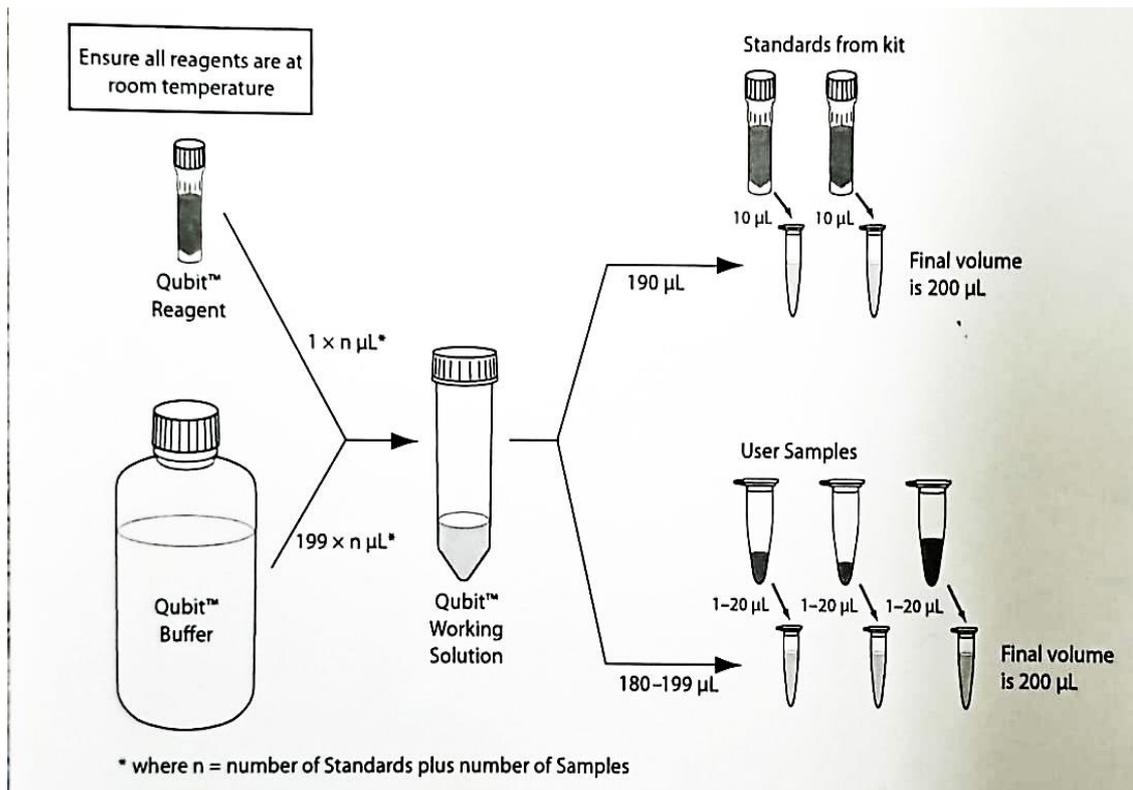


Figura. Esquema da solução de trabalho.

1. Identifique os tubos que serão usados (dois tubos padrão e nº amostras a quantificar).
 2. Em um tubo falcon 15 mL, protegido com alumínio, adicione $n^{\circ} \times 199$ uL de buffer Qubit.
 3. Ao mesmo tubo falcon, adicione $n^{\circ} \times 1$ uL de reagente Qubit.
- Obs.: “ n° ” no tópico 2 e 3 é o número de amostras (amostras a quantificar + dois tubos padrão + amostras a mais para compensar perda de pipetagem).
4. Homogenize a solução de trabalho (invertendo algumas vezes ou por vortexação).
 5. Nos tubos que serão analisados os padrões do Qubit, adicione 190 uL da solução de trabalho Qubit.
 6. Nos tubos das amostras, adicione 199 uL da solução de trabalho Qubit.
 7. No tubo do padrão 1 (S1), adicione 10 uL da solução padrão Qubit 1, homogeneizando com a pipeta.
 8. No tubo do padrão 2 (S2), adicione 10 uL da solução padrão Qubit 2, homogeneizando com a pipeta.
 9. Nos tubos das amostras, adicione 1 uL da amostra de DNA a quantificar, homogeneizando com a pipeta.
 10. Vortexe todos os tubos por 2-3 segundos para homogeneizar a mistura.
 11. Incube todos os tubos por 2 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, antes de iniciar as leituras.

Quantificação:

1. Ligue o Qubit 2.0 Fluorometer.

2. Escolha a opção *DNA*.
3. Na aba "Home", em "Choose You Assay:" escolha a opção *dsDNA Broad Range*.
4. Na aba "Standards", em "Insert Standards 1", coloque o tubo de leitura com o padrão 1 (S1):
 - 4.1. Abra a tampa.
 - 4.2. Homogenize o conteúdo do tubo por inversão e em seguida posicione o tubo padrão 1 na abertura abaixo da tampa.
 - 4.3. Feche a tampa.
 - 4.4. Clique em "Read".
 - 4.5. Aguarde o equipamento fazer a leitura do padrão 1.
 - 4.6. Despreze o tubo no descarte.
5. Na aba "Standards", em "Insert Standards 2", coloque o tubo de leitura com o padrão 2 (S2):
 - 5.1. Abra a tampa.
 - 5.2. Homogenize o conteúdo do tubo por inversão e em seguida posicione o tubo padrão 2 na abertura abaixo da tampa.
 - 5.3. Feche a tampa.
 - 5.4. Clique em "Read".
 - 5.5. Aguarde o equipamento fazer a leitura do padrão 2.
 - 5.6. Despreze o tubo no descarte.
6. Na aba "Sample", em "Insert Assay Tube", coloque o tubo de leitura com a amostra:
 - 6.1. Abra a tampa.
 - 6.2. Homogenize o conteúdo do tubo por inversão e em seguida posicione o tubo com a amostra na abertura abaixo da tampa.
 - 6.3. Feche a tampa.
 - 6.4. Clique em "Read".
 - 6.5. Aguarde o equipamento fazer a leitura do tubo de leitura com a amostra.
 - 6.6. Altere a unidade de medida de mg/mL para ng/uL. Clique em "Calculate Stock Conc.". Será aberta a janela "Choose Unit", então escolha a opção ng/uL.
 - 6.7. Altere o volume da amostra de 10 uL para 1 uL. Em "Volume of Sample Used", escolha "1 uL".
 - 6.8. Registre o resultado emitido na tela (APÊNDICE I).
 - 6.9. Despreze o tubo no descarte.
 - 6.10. Clique em "Read Next Sample".

Após a quantificação:

1. Desligue o equipamento (clcando no botão power).
2. Desligue o equipamento (retirando da tomada).
3. Limpe a bancada.
4. Não deixe vestígios.

APÊNDICE F – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO TESTE DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM
Laboratório de Genética Humana

PROTOCOLO DE PREPARO DA PLACA PARA GENOTIPAGEM POR qPCR <i>Real Time</i> TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assay (PCR em Tempo Real)
Catalog number: 4362691 https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4362691#/4362691
Escrito e adaptado por: Karwhory Wallas Responsável: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares

Orientações:

1. AGENDAR o uso do equipamento no laboratório do piso 8.
2. Antes de tudo, prepare as amostras para que estejam nas concentrações adequadas (10 ng/μL).
3. Vestir o jaleco adequado.
4. Separar papel toalha e álcool.
5. Limpar os fluxos laminares (álcool 70% e 15 min de luz UV) antes de começar. Leve as caixas de ponteiras, racks e tubos vazios e coloque-os dentro do fluxo antes da UV.
6. Descongelar no gelo o master mix 2X, Taqman 20X e H₂O ultrapura livre de nucleases.
7. Separar a caneta de identificação. Ao final, trazer para o LBI todos os materiais usados na reação de genotipagem por qPCR.
8. Desinfetar todos os itens com álcool 70% antes de os colocar no fluxo.

Materiais necessários:

1. Tubo cônico para o pré-mix.
2. Caixa de isopor com gelo.
3. Utensílios: micropipetas de 10, 20 e 200 μL, ponteiras, racks de tubos, suporte para placa de 96 poços, placa de qPCR e selante óptico.
4. Soluções: 2X TaqMan Universal PCR Master Mix, 20X Drug Metabolism Genotyping Assay Mix, amostras de DNA a 10 ng/μL, H₂O ultra pura.

Volume de reagentes por poço para a placa de 96 poços

Tabela 1. Volumes das soluções para cada experimento.

Reagente	Reação 1x 96 poços (μL)
<i>Universal Master Mix (2X)</i>	5
<i>Assay Working Stock (20X)</i>	0.5
<i>H₂O DNase free</i>	3.0

Volume total	8.5
DNA (10ng/μL)	1.5
Volume final	10

Obs.: Em seus cálculos, inclua algumas reações extras para compensar a perda de volume que ocorre durante a pipetagem. recomenda-se calcular 10% a mais do número de amostras total. Catalog Number do *Universal Master Mix (2X)*: 4304437.

Cálculos para reação de PCR 10 μL

Universal Master Mix	Assay Working Stock	H₂O DNase free	DNA
$2x \cdot V_1 = 1x \cdot 10\mu\text{L}$	$20x \cdot V_1 = 1x \cdot 10\mu\text{L}$	$10\mu\text{L} - 1.5 \mu\text{L} = 8.5 \mu\text{L}$	$10 \text{ ng} \cdot 1,5 = C_2 \cdot 10\mu\text{L}$
$2x \cdot V_1 = 10\mu\text{L}$	$20x \cdot V_1 = 10\mu\text{L}$	$5 + 0.5 = 5.5 \mu\text{L}$	$15 = C_2 \cdot 10\mu\text{L}$
$V_1 = 10/2$	$V_1 = 10/20$	$8.5 \mu\text{L} - 5.5 \mu\text{L} = 3.0 \mu\text{L}$	$C_2 = 15/10$
$V_1 = 5 \mu\text{L}$	$V_1 = 0,5 \mu\text{L}$		$V_1 = 1,5 \text{ ng}$

Tabela 2. Informações técnicas das sondas utilizadas na genotipagem (20X Drug Metabolism Genotyping Assay Mix).

Catalog number	Sonda (ID)	Sequência [VIC/FAM]	SNV	Alelo estrela
4362691	C__25986767_70	TTCCCACTATCATTGATTATTTCCC[A>G] GGAACCCATAACAAATTACTTAAAA	rs4244285	*2
4362691	C__27861809_10	ACATCAGGATTGTAAGCACCCCTG[A>G] ATCCAGGTAAGGCCAAGTTTTTGC	rs4986893	*3
4362691	C__469857_10	AAATTTGTGTCTTCTGTTCTCAAAG[C>T] ATCTCTGATGTAAGAGATAATGCGC	rs12248560	*17

https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C__25986767_70?CID=&ICID=&subtype=

https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C__27861809_10?CID=&ICID=&subtype=

https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C__469857_10?CID=&ICID=&subtype=

Preparo do pré-mix:

1. Dê um spin no tubo de *2X TaqMan Universal PCR Master Mix (UMM)*. Realize um *up/down* brevemente para homogeneizar. Certifique-se de que o 2X UMM esteja homogêneo (e sem gelo) antes de usar. Obs.: Cuidado para não aquecer o tubo com a mão ou fora do gelo por muito tempo.
2. Dê um spin no tubo da sonda *20X Drug Metabolism Genotyping Mix* brevemente. Realize um *up/down* brevemente para homogeneizar. Obs.: Cuidado para não aquecer o tubo com a mão ou fora do gelo por muito tempo. Use sempre o papel alumínio no tubo para proteger a sonda.

3. Em um novo tubo cônico de 1,5 mL pipete os volumes totais de $2\times$ UMM, $20\times$ Drug Metabolism Genotyping Mix e de H₂O, nesta ordem (de acordo com a Tabela 1). Obs.: Pipetar devagar para não formar bolhas no tubo.
4. Inverta o(s) tubo(s) para misturar. Centrifugar o(s) tubo(s) brevemente para o conteúdo descer e eliminar quaisquer bolhas de ar da solução.
5. Colocar a placa de 96 poços no suporte dentro da capela de trabalho, tomando cuidado para não encostar no fundo dos poços (onde vai ser realizada a leitura). Segure apenas nas laterais.
6. Pipetar o volume de pré-mix necessário em cada poço. E pipete o volume de H₂O necessário no poço “branco” e no poço do controle negativo (de acordo com o desenho da placa no APÊNDICE I).
7. Levar a placa para a capela de trabalho com cDNA, segurando apenas nas laterais.

Preparo da placa de 96 poços:

8. Colocar a placa de 96 poços no suporte dentro da capela de trabalho, tomando cuidado para não encostar no fundo dos poços
 9. Pipetar suavemente o volume das amostras em cada poço, atentando-se para o controle positivo (de acordo com o desenho da placa no APÊNDICE I).
 10. Remover completamente o papel branco do selante e posicione em cima da placa, de forma alinhada (ver linha picotada).
 11. Selar bem a placa, com cuidado para não formar bolhas (faça de forma uniforme e contínua, seguindo uma única direção). Use a espátula para selar as bordas dos poços, principalmente os que estão preenchidos com os reagentes.
- Obs.: Proteja a placa selada da luz, envolvendo-a com papel alumínio.
12. Para remover qualquer bolha nos poços da placa, dê um *spin* na placa, com o fundo dos poços para fora da centrífuga.

Antes da ciclagem:

1. Para remover qualquer bolha de ar nos polos da placa, dê um *spin* na placa. Obs.: Usar outra igual para equilibrar o peso na centrífuga.

Preparo da ciclagem:

2. Ligar o termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System da Applied Biosystems na chave traseira (Ele já estará ligado à tomada).
3. Ligar o computador (há dois usuários, usar o da direita, clicando em “usuário”).
4. Aguarde o termociclador inicializar para sincronizar com o software.
5. Abrir o programa “StepOne™ Software v2.2.2” (Não é necessário login ou senha).
 - 5.1. Será aberta a janela “Controle de Conta de Usuário”, clique em “Sim”.

- 5.2. Será aberta a janela “Login”, com a opção “GUEST” no campo “User Name:” clique em “Login in as Guest”.
6. Com o programa aberto, clique em “Advanced Setup”.
7. Na sub-aba “Experiment Properties” ao lado esquerdo, defina as configurações:
- 7.1. Em “Experiment Name” digite o nome do experimento: CYP2C19 AAAA-MM-DD.
 - 7.2. Em “Which instrument are you using to run the experiment?”, escolha a opção “StepOnePlus™ Instrument (96 Wells)”.
 - 7.3. Em “What type of experiment do you want to set up?”, escolha a opção “Genotyping”.
 - 7.4. Em “Which reagents do you want to use to detect the target sequence”, escolha a opção “TaqMan® Reagents”.
 - 7.5. Em “Which ramp speed do you want to use in the instrument run?”, escolha a opção “Standard (~2 hours to complete a run)”.
 - 7.6. Em “What do you want to include in the instrument run?”, marque as opções “Pre-PCR Read”, “Amplification” e “Post-PCR Read”.
8. Clique na sub-aba “Plate Setup” ao lado esquerdo e nela, e em “Assign SNP Assay(s) to the Selected Wells” defina as configurações:
- 8.1. Edite o SNP que já vai está preenchido automaticamente. Selecione o SNP clicando na seta ao lado de “Edit>Edit SNP Assay...”. Será aberta a janela “Edit SNP Assay”, então, no campo “SNP Assay Name” digite o alelo e o rs do SNP: (*2) rs4244285. No campo “Allele 1 Name or Base(s)”, defina a fluorescência do repórter VIC: A; e no campo “Allele 2 Name or Base(s)”, defina a fluorescência do repórter FAM: G. Mantenha os Quencher como “NFQ-MGB”. Clique em “OK”.
 - 8.2. Adicione um novo SNP. Clicando em “Create New SNP Assay>”. Será aberta a janela “New SNP Assay”, então, no campo “SNP Assay Name” digite o alelo e o rs do SNP: (*3) rs4986893. No campo “Allele 1 Name or Base(s)”, defina a fluorescência do repórter VIC: A; e no campo “Allele 2 Name or Base(s)”, defina a fluorescência do repórter FAM: G. Mantenha os Quencher como “NFQ-MGB”. Clique em “OK”.
 - 8.3. Adicione um novo SNP. Clicando em “Create New SNP Assay>”. Será aberta a janela “New SNP Assay”, então, no campo “SNP Assay Name” digite o alelo e o rs do SNP: (*17) rs12248560. No campo “Allele 1 Name or Base(s)”, defina a fluorescência do repórter VIC: C; e no campo “Allele 2 Name or Base(s)”, defina a fluorescência do repórter FAM: T. Mantenha os Quencher como “NFQ-MGB”. Clique em “OK”.

OBS: As nossas sondas atuais possuem os repórteres VIC/FAM e o quencher NFQ-MGB, porém é indispensável saber o VIC/FAM específico de cada alelo.

9. Ainda na sub-aba “Plate Setup”, em “Assign Sample to the Selected Wells” defina as configurações:
- 9.1. Insira o conteúdo de cada poço da placa de 96 poços (amostras e controles). Clique várias vezes em “Add New Sample”, até atingir o número de amostras pipetadas. Dê duplo clique em cada no nome “Sample N” para renomear.

10. Ainda na sub-aba “Plate Setup”, em “Select the dye to use as the passive reference”, escolha a opção ROX.

OBS: O Master Mix utilizado (TaqMan® Universal PCR Master Mix) possui o ROX como *passive reference*.

11. Ainda na sub-aba “Plate Setup”, em “View Plate Layout” do lado direito defina as configurações:

- 11.1. Clique em cada poço individualmente (pode selecionar vários simultaneamente) e “marque” a sonda TaqMan, digitada anteriormente em “Assing SNP Assay(s) to the Selected Wells” e o nome da amostra, em “Assing Sample to the Selected Wells” correspondente. Faça isso para todos os poços pipetados.
- 11.2. Quando o poço se tratar do do controle positivo, se for heterozigoto (o ideal), na janela “Assing SNP Assay(s) to the Selected Wells” na coluna “Task” e na linha da respectiva sonda, escolha a opção “Positive Control Allele 1/Allele 2”, individualmente.
- 11.3. Quando o poço se tratar do do controle negativo (o ideal é usar a mesma solução que o DNA foi eluído no final da extração), na janela “Assing SNP Assay(s) to the Selected Wells” na coluna “Task” e na linha da respectiva sonda, escolha a opção “Negative Control”, individualmente.

Obs.: Se quiser colorir os poços (opcional), em “View Plate Layout” clicar em “Show in Wells>Sample Color”.

12. Clique na sub-aba “Run Method” ao lado esquerdo e nela, e em “Graphical View” defina as configurações:

12.1. No campo “Reaction Volume Per Well” digite 10 µL .

12.2. No gráfico, defina as condições de ciclagem conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Configurações de ciclagem para ensaios de genotipagem farmacogenética utilizando sondas TaqMan.

Etapa	Temperatura e Tempo	Nº de ciclos
Pre-PCR Read (Holding Stage)	60°C por 30 segundos	1 ciclo
Ativação da polimerase e desnaturação (Holding Stage)	95°C por 10 minuto	1 ciclo
Desnaturação (Cycling Stage)	95°C por 15 segundos	75 ciclos
Anelamento e extensão (Cycling Stage)	60°C por 1 minuto	
Post-PCR Read (Holding Stage)	60°C por 30 segundos	1 ciclo

13. Clique na sub-aba “Reaction Setup” ao lado esquerdo e nela, e em “Reaction Mix Calculations” confira as informações sobre as soluções de cada poço pipetado, conforme a Tabela 2.

OBS: Esta etapa não interfere nos resultados, apenas auxilia o pesquisador para ter dimensão se sua amostra foi montada corretamente.

Tabela 2. Volumes das soluções para cada experimento.

Reagente	Reação 1x p/ poço de 10 µL
<i>Universal Master Mix (2X)</i>	5
<i>Assay Working Stock (20X)</i>	0.5
H ₂ O DNase free	3.0
DNA (10ng/µL)	1.5
Volume final	10

14. Salve as configurações do método da reação programada para o experimento. Clique na seta ao lado da ilustração do disquete (Save) e depois em "Save as...". Será aberta a janela "Save", então, salve com um nome (Exemplo: CYP2C19 AAA-MM-DD.eds) em uma pasta de fácil acesso (Biblioteca/Documentos/Fernanda R Soares). Clique em "Save".
15. Em seguida você deve enviar essa configuração para a máquina. Clique em "Send Experiment to Instrument" na parte superior. Será aberta a janela "Send Experiment to Instrument" para você selecionar o arquivo que você salvou na etapa anterior.
 - 15.1. No campo "Selected Experiment", clique em "Browser...". Será aberta a janela "Open" para localizar o arquivo. Selecione o arquivo salvo na etapa 14.
 - 15.2. Depois, clique em "Open" para escolher o arquivo.
 - 15.3. De volta na janela "Send Experiment to Instrument", clique em "Send Experiment".
 - 15.4. Será aberta a janela "Send Complete", então clique em "OK".
16. Abra manualmente a "gaveta" do termociclador "StepOnePlus Real-Time PCR System".
 - 16.1. Retire a placa padrão do dispositivo.
 - 16.2. Insira a placa do experimento corretamente.
17. Feche a "gaveta" com a placa manualmente.
18. No programa do computador, clique em "Start Run" no canto superior direito da tela. E confira se a ciclagem foi iniciada sem obstáculos.

Obs.: Ao iniciar os ciclos você poderá acompanhar a amplificação em tempo real, basta clicar na sub-aba "Multicomponent Plot" da aba "Analysis" no canto esquerdo. Haverá um espaço no centro (Plot) que representará, como gráfico, todo o processo à medida que o DNA vai se amplificando. Este gráfico pode ser alterado para se mostrar visualmente das mais diversas formas e cores. Você poderá configurar tudo isso nos diversos botões à esquerda, no centro, e inclusive poder ver um gráfico que representaria um único poço da placa (basta clicar no poço do seu interesse).

Após a ciclagem:

19. Clique na seta ao lado de “Export>Export...”, será aberta a janela “Export Data”. Na aba “Export Properties”, defina as configurações:
 - 19.1. No campo “1. Select data to export”, marque todas as opções (Sample Setup, Results, Raw Data, Multicomponent Data, Amplification Data).
 - 19.2. No campo “2. Select one file or separate files” escolha a opção “Separate Files”.
 - 19.3. No campo “3. Enter export file properties”, na opção “Sample Setup” defina uma pasta no pen drive onde será salvo cada arquivo. No subcampo “Export File Location”, clique em “Browse”.
 - 19.4. Será aberta a janela “Open” escolha uma pasta no pen drive e clique em “Open”.
 - 19.5. Copie o caminho da pasta para as outras opções de arquivo, individualmente (Results, Raw Data, Multicomponent Data, Amplification Data).
 - 19.6. Clique em “Start Export”.
 - 19.7. Será aberta a janela “Export Completed”, então clique em “Close Export Tool”.

20. Salve toda reação (métodos e resultados) do experimento como arquivo do programa. Clique na seta ao lado da ilustração do disquete (Save) e depois em “Save as...”. Será aberta a janela “Save”, então, salve com um nome (Exemplo: CYP2C19 AAA-MM-DD.eds) em uma pasta no pen drive. Clique em “Save”.

Obs.: Antes de ejetar o pen drive, confira se os seis arquivos estão realmente no pen drive. Ejete o pen drive com segurança.

21. Abra manualmente a “gaveta” do termociclador “StepOnePlus Real-Time PCR System”.
 - 21.1. Retire a placa do experimento.
 - 21.2. Insira a placa padrão do dispositivo.

22. Feche a “gaveta” sem a placa manualmente.

23. Feche o programa “StepOne™ Software v2.2.2”.

24. Na tela touch do termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System da Applied Biosystems, clique no símbolo “Power” e na janela “Power Off”, clique em “Yes”.

25. Desligar o termociclador na chave localizada atrás.

26. Desligar o computador.

27. Descarte a placa no lixo de material biológico. Obs.: Caso não tenha uma equilibrar a centrífuga, guarde sempre uma.

28. Não deixar vestígios.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP-UFTM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FARMACOGENÉTICA CARDIOVASCULAR E ANCESTRALIDADE NO BRASIL

Pesquisador: FERNANDA RODRIGUES SOARES

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 71061822.4.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro - MG

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.233.152

Apresentação do Projeto:

O projeto está sendo reapresentado com o objetivo de atender pendência(s) apontada(s) no parecer nº 6.182.392.

As informações elencadas nos campos “Apresentação do Projeto”, “Objetivo da Pesquisa” e “Avaliação dos Riscos e Benefícios” foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2005831.pdf, de 21/07/2023) e do Projeto Detalhado (MODELO_PROJETO_2023_07_17.docx, de 21/07/2023).

Segundo os pesquisadores:

"INTRODUÇÃO: O clopidogrel é um pró-fármaco prescrito para prevenção de eventos aterotrombóticos que necessita das enzimas do citocromo P450 (CYP) para biotransformação em seu metabólito tiol ativo, inibindo o receptor purinérgico P2Y12 das plaquetas, integrantes de uma das vias de coagulação (Pereira et al., 2019).

Embora no Brasil o clopidogrel seja o medicamento de escolha e amplamente utilizado em pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA) e pós-intervenção coronária percutânea (ICP) para prevenir eventos aterotrombóticos, a resposta individual ao pró-fármaco é altamente variável, podendo alguns pacientes apresentarem uma hiporresponsividade, resistência ao medicamento ou

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões

Bairro: Abadia

CEP: 38.025-440

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6803

E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 6.233.152

falha terapêutica, enquanto outros apresentam reações adversas medicamentosas (RAMs) (Shahabi et al., 2015; Schilling et al., 2020).

Essa problemática ocorre devido a variações clínicas que incluem a baixa adesão do paciente, dosagem inadequada, idade, doenças subjacentes e índice de massa corporal e a ocorrência de interações medicamentosas. Além disso, as variáveis individuais incluem polimorfismos genéticos que influenciam a atividade da CYP2C19 (enzima que ativa o pró-fármaco) e proteína receptora plaquetária P2Y12 e variabilidade de absorção intestinal de drogas (Zhang et al., 2022).

Dentre as enzimas do tipo citocromo P450, a CYP2C19 é a principal responsável pela catálise da conversão, no fígado, do clopidogrel em sua forma ativa. Até o momento, foram identificados 36 polimorfismos no gene da enzima, sendo que CYP2C19*2, CYP2C19*3 e CYP2C19*17 são os mais comuns. Os polimorfismos CYP2C19*2 e CYP2C19*3 são caracterizados pela perda completa ou parcial da atividade da enzima CYP2C19, enquanto CYP2C19*17 é caracterizado pelo incremento da atividade da enzima (Li et al. 2021). De acordo com o fenótipo predito, os indivíduos são classificados como metabolizadores lentos (*2/*2, *2/*3 ou *3/*3), intermediários (*1/*2, *1/*3, *2/17 e *3/*17), normais (*1/*1), rápidos (*1/*17) ou ultrarrápidos (*17/*17) de CYP2C19.

A frequência destes polimorfismos e fenótipos preditos não é uniforme nas populações, ou seja, há variabilidade populacional/interétnica. Rodrigues-Soares et al. (2018) relatam maior frequência do CYP2C19*2 em indivíduos brancos da população brasileira e menor frequência dos polimorfismos CYP2C19*2 e CYP2C19*17 nos nativo-americanos brasileiros que em outras populações do país. Correlações entre alelos de genes CYP, como o CYP2C19*17, e ancestralidade genômica já foram encontradas em populações latino-americanas por nosso grupo de pesquisa (Rodrigues-Soares et al. 2020), no entanto, há pouca evidência de estudos utilizando pacientes usuários de clopidogrel e CYP2C19 em nosso país.

O Consórcio de Implementação Clínica de Farmacogenética (CPIC) recomenda que metabolizadores lentos e intermediários façam preferencialmente o uso de prasugrel ou ticagrelor, antiagregantes plaquetários alternativos, para evitar possíveis efeitos adversos (Lee et al., 2022). No entanto, tais medicamentos custam cerca de 7x mais no Brasil que o clopidogrel, e não são dispensados pelo SUS.

Além do teste genético, a resposta inadequada ao clopidogrel também pode ser mensurada por meio de um teste com agregômetro, visando quantificar a intensidade da agregabilidade plaquetária mediada pela via do ADP. Entretanto, esta prática ainda não está muito bem estabelecida dentro da literatura.

Uma aplicação farmacogenética bem consolidada para ser transferida para a prática clínica envolve

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 6.233.152

pacientes cardiovasculares com prescrição do antiagregante plaquetário clopidogrel. No contexto do Serviço de Cardiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), avaliaremos a viabilidade e pertinência de implementar em Minas Gerais a genotipagem de biomarcadores farmacogenéticos e medida de agregação plaquetária como ferramenta na tomada de decisões terapêuticas em pacientes com prescrição de clopidogrel testando a hipótese que entre os pacientes cardiovasculares com prescrição de clopidogrel, os metabolizadores lentos e intermediários para CYP2C19, definidos a partir do teste genético, têm um risco maior de apresentar eventos isquêmicos em relação a outros pacientes. Adicionalmente, a ancestralidade genômica e possíveis genótipos relacionados serão inferidos para que sejam realizadas possíveis correlações desta covariável com a resposta ao clopidogrel."

"MÉTODO(S) A SER(EM) UTILIZADO(S): Será realizado um estudo piloto caso-controle, que busca identificar os pacientes que são metabolizadores lentos e intermediários (casos) e normais/rápidos/ultrarrápidos (controles) de clopidogrel, utilizando biomarcadores de polimorfismos genéticos e avaliação de agregação plaquetária.

Indivíduos maiores de 18 anos de idade que fazem uso do clopidogrel e passaram por procedimento de angioplastia (stent) serão convidados a participarem voluntariamente do estudo mediante a autorização, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Cada paciente contribuirá com uma amostra de sangue periférico, autorização de uso de informações do prontuário médico e respostas a um questionário previamente elaborado (anexo ao TCLE).

Serão convidados 1000 pacientes que fazem uso dos serviços de cardiologia em tratamento com clopidogrel no Hospital das Clínicas da UFTM e do Hospital das Clínicas da UFMG, dentro das 48h após administração de dose de ataque do medicamento. Os participantes serão convidados a participarem da pesquisa após a abordagem verbal do pesquisador, será detalhado em linguagem simplificada como funcionará todo o processo, desde a coleta até os resultados e armazenamentos de materiais para possíveis pesquisas futuras. Após o consentimento do paciente, será entregue o TCLE para que leia, e, caso o participante tenha limitações para escrita e leitura, o pesquisador presente auxiliará na interpretação do termo. Logo após, solicitaremos a assinatura do participante em duas vias, nos autorizando iniciar a pesquisa, e, se porventura o indivíduo não tiver conhecimento de escrita, será aceito o carimbo da digital no local da assinatura. Logo, uma via será pertencente ao participante.

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 6.233.152

No grupo caso serão incluídos os pacientes com fenótipo predito como metabolizadores lentos e intermediários de clopidogrel e no grupo controle, os outros metabolizadores. Os pacientes serão acompanhados pelo período de no mínimo doze meses, para identificar ocorrência de eventos adversos cardiovasculares.

Além disso, existe a possibilidade de envio dos dados coletados para exterior para serem analisados e incluídos em novas pesquisas, caso haja colaboração com instituições estrangeiras, de acordo com a Resolução CNS nº 340 de 2004, mediante à autorização de armazenamento e envio do material biológico por parte dos participantes.

Todos os procedimentos serão iniciados somente após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFTM e da UFMG."

"CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES

Critério de inclusão

1. Pacientes que apresentaram síndrome coronária aguda com colocação de stent, fazendo o uso de clopidogrel e com capacidade cognitiva para assinar o TCLE

Critérios de exclusão

1. Qualquer desvio que não corrobore com os critérios acima.
2. Pacientes menores de 18 anos de idade;
3. Mulheres grávidas;
4. Pessoas que fazem uso de prasugrel ou ticagrelor;
5. Pacientes com alergia ao clopidogrel;
6. Ausência de informações nos prontuários."

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores:

"Objetivo primário:

Avaliar a viabilidade e pertinência de implementar no Brasil a genotipagem de biomarcadores farmacogenéticos e biomarcadores de agregometria (point-of-care) como ferramenta para tomada de decisões terapêuticas em pacientes com prescrição de clopidogrel."

"Objetivos secundários:

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia CEP: 38.025-440
UF: MG Município: UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 6.233.152

1. Testar a hipótese que entre os pacientes brasileiros miscigenados cardiovasculares com prescrição de clopidogrel, os metabolizadores lentos e intermediários para CYP2C19 têm maior risco de apresentar eventos cardiovasculares importantes, como infarto do miocárdio, angina instável e morte cardiovascular, que outros tipos de metabolizadores para CYP2C19.
2. Definir a arquitetura genética da resposta a clopidogrel em brasileiros miscigenados.
3. Avaliar as diferenças nos níveis da expressão gênica nas plaquetas em pacientes metabolizadores lentos, intermediários e normais para CYP2C19 sob prescrição de clopidogrel.
4. Avaliar a ancestralidade genômica desses pacientes e sua possível correlação com as características clínicas e genéticas avaliadas."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

"Riscos

- Como se trata de um procedimento invasivo, é possível que ocorra hematoma no local de punção, vermelhidão e incômodo durante a coleta. Limitamos que os pesquisadores responsáveis por essa etapa sejam qualificados e tenham experiência em punção periférica, além de seguir o protocolo de Procedimento Operacional Padrão (POP) específico de cada instituição participante.

- Em relação aos dados coletados, mencionamos, por menor que seja, o risco possível de perda de confidencialidade durante a coleta, transporte e armazenamento. Integramos que a equipe mantém rigorosamente o cuidado e proteção de dados. O material coletado será identificado com o número de atendimento do participante, apenas os pesquisadores terão conhecimento de nome, sobrenome e demais informações pessoais. Durante o transporte do material biológico, contaremos com caixas próprias, lacradas e íntegras, a fim de evitar acidentes, perda ou roubo. O laboratório onde acontecerá a pesquisa possui softwares e sistemas operacionais atualizados e seguros, sem risco de vulnerabilidade, também limitado o acesso apenas aos pesquisadores participantes.

Benefícios

- As informações de agregometria e o genótipo de CYP2C19 serão disponibilizadas ao médico tratante do paciente. Os pacientes, a critério do médico tratante, poderão ter seu tratamento redirecionado para um outro fármaco que possa ter uma resposta terapêutica mais rápida e

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 6.233.152

adequada, ressaltando que não haverá introdução de tratamento novo;

- Geração de conhecimento para posterior implantação da farmacogenética na terapia de antiagregação plaquetária;

- No final da pesquisa, será preparado um relatório com linguagem adequada, resumindo os resultados obtidos a ser discutido com autoridades de saúde pública do Estado e do Ministério da Saúde;

- Envio de informações para a Sociedade Brasileira de Cardiologia para contribuir com as diretrizes de uso de antiplaquetários e divulgação dos resultados com o Sistema Único de Saúde."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de retorno de parecer anterior (6.182.392), em que os pesquisadores atenderam as solicitações do CEP-UFTM.

Os pesquisadores propõem realizar um estudo junto a 500 participantes que fazem uso dos serviços de cardiologia em tratamento com clopidogrel no Hospital das Clínicas da UFTM e outros 500 pacientes de mesmo perfil, usuários do Hospital das Clínicas da UFMG.

Equipe de pesquisadores vinculada na Plataforma Brasil: Profa Dra Fernanda Rodrigues Soares (Responsável Principal) e pesquisadores relacionados: Eduardo Martín Tarazona Santos, Antonio Luiz Pinho Ribeiro, Rone Marques Padilha, Luiz Guilherme Passaglia, Caique Manochio Nunes Da Silva, Mariana Meira Scudeler, Maria Laura Chaves Alves, Karwhory Wallas Lins Da Silva e Gabriel Batista.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e Norma Operacional 001/2013, o Colegiado do CEP-UFTM manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 6.233.152

O CEP-UFTM informa que de acordo com as orientações da CONEP, o pesquisador deve notificar na página da Plataforma Brasil, o início do projeto. A partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestrais), assim como também é obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2005831.pdf	21/07/2023 10:47:58		Aceito
Outros	Resposta_CEP.pdf	21/07/2023 10:47:21	FERNANDA RODRIGUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MODELO_PROJETO_2023_07_17.docx	21/07/2023 10:45:31	FERNANDA RODRIGUES SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modelo_UFTM_2023_07_17.docx	21/07/2023 10:44:50	FERNANDA RODRIGUES SOARES	Aceito
Declaração de concordância	carta_anuencia.pdf	04/07/2023 13:39:51	FERNANDA RODRIGUES	Aceito
Outros	FORMULARIO_PRONTUARIO.doc	04/07/2023 13:37:02	FERNANDA RODRIGUES	Aceito
Outros	PACIENTE_FORMULARIO.doc	04/07/2023 13:35:44	FERNANDA RODRIGUES	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinada.pdf	04/01/2023 10:43:03	FERNANDA RODRIGUES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 6.233.152

UBERABA, 11 de Agosto de 2023

Assinado por:
Alessandra Cavalcanti de Albuquerque e Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br