

LILLIAN HARBOE GONÇALVES

DIABETES MELLITUS TIPO 2 E USO DE ÁCIDO  
ACETILSALICÍLICO: RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE 11-  
DIHIDRO TROMBOXANO URINÁRIO E VARIÁVEIS  
CLÍNICAS, GENÉTICAS, HEMOSTÁTICAS E  
BIOQUÍMICAS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Carvalho

Co-orientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Salles Moura  
Fernandes

Prof<sup>a</sup>. Dra. Karina Braga Gomes Borges

**Faculdade de Farmácia da UFMG**

**Belo Horizonte, MG**

**2010**

## Folha de aprovação

Dedico este trabalho à memória de Izidoro,  
meu fiel companheiro por mais de trinta anos,  
que tão bem entendeu meus sonhos  
e me incentivou a realizá-los.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria das Graças Carvalho pelo exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança em mim demonstrada e pela amizade oferecida.

Às minhas co-orientadoras Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes e Prof<sup>a</sup>. Dra. Karina Braga Gomes Borges pelo apoio e ajuda na elaboração e desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Marinez de Oliveira Sousa pela grande ajuda na realização das análises bioquímicas incluídas neste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse e ao Prof. Dr. Lauro Mello Vieira pela amável acolhida no laboratório de Hematologia e sugestões apresentadas.

Aos médicos endocrinologistas Dra. Adriana Aparecida Bosco e Dr. Daniel Dutra Romualdo da Silva pela ajuda na seleção dos pacientes.

Ao prof. Dr. Gerson Antonio Pianetti e equipe pela inestimável colaboração na realização do teste para comprovação da adesão ao uso do ácido acetilsalicílico por parte dos pacientes participantes deste estudo.

À Mirelle Sóter Oliveira pela grande ajuda na triagem dos pacientes e no levantamento de dados clínicos a partir dos prontuários dos pacientes, bem como pela realização dos testes de hemoglobina glicada.

À farmacêutica Geralda de Fátima Guerra Lages pelo apoio técnico em todos os momentos.

A todos os funcionários do Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG, especialmente ao Márcio Jacinto de Oliveira pela grande ajuda na coleta das amostras de sangue e à Marisa de Jesus Costa pelo apoio técnico.

Ao núcleo de pós-graduação e pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte na pessoa do seu coordenador, Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva, pela amável acolhida e inestimável apoio visando à formação do grupo de estudo de paciente diabéticos tipo 2.

À professora e mestre Flávia Komatsuzaki pelo excelente trabalho de análise estatística realizado com os dados obtidos nesta pesquisa.

Às bolsistas de iniciação científica Fernanda Rocha Freitas, Michelle Teodoro Alves e Kathryn Fontana Rodrigues pelo auxílio nas análises de Biologia Molecular.

Aos colegas da pós graduação Claudia Natália Ferreira, Danielle Romana Alves, Adriano Basques Fernandes e Anna Letícia Soares pelo apoio recebido que indubitavelmente facilitou a realização deste trabalho.

À grande amiga-irmã e colega de pós graduação Anna Paula de Borba Batschauer pela amizade que amenizou as dificuldades enfrentadas durante o curso.

À Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação nas pessoas do Dr. Aloysio Campos da Paz Junior, Dra. Lucia Willadino Braga, Dr. Paulo Roberto de Freitas Guimarães e Dra. Júlia Filardi de Oliveira Paim pelo apoio institucional que me permitiu a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do Hospital Sarah Belo Horizonte pela amabilidade e empenho em obter a bibliografia necessária à fundamentação teórica deste trabalho.

Aos colegas de trabalho no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Sarah Belo Horizonte e, em especial, às minhas amigas Gislane Maria Carvalho Baião, Lenice de Oliveira Piedade, Marília Trópia de Barros e Marina Franchini de Oliveira pelo apoio constante que me ajudou a vencer os desafios que surgiram no decorrer desta pesquisa.

A todos os pacientes que doaram material biológico, tempo e boa vontade, sem os quais este trabalho não seria realizado.

Aos meus filhos Thelmo, Carolina e Maina pelo incentivo e apoio nos momentos de dificuldade.

A Nazaré da Silva Paulino, minha fiel escudeira, que com muita dedicação cuidou de mim, de meus filhos e de minha casa, permitindo que eu tivesse mais tempo para me dedicar aos estudos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores.

Se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas.

Se não houver folhas,  
valeu a intenção da semente.

Henfil (1944-1988)

## RESUMO

O ácido acetilsalicílico (AAS) é o agente antiplaquetário mais utilizado para a prevenção de evento aterotrombótico em pacientes diabéticos, pois inativa a enzima ciclooxigenase-1 e, portanto, constitui um inibidor da formação de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Este estudo foi delineado com o objetivo de investigar o efeito do AAS na produção de TXA<sub>2</sub> em indivíduos diabéticos, em uso diário de 100mg de AAS para a prevenção primária de evento aterotrombótico. A amostra foi constituída por pacientes atendidos no ambulatório de diabetes mellitus 2 do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte. Foram coletadas duas amostras de urina e de sangue de cada paciente, sendo a primeira imediatamente antes do início do uso de AAS e, a segunda, aos quinze dias de uso diário deste medicamento. Nas amostras de urina foram avaliados os níveis urinários de um marcador de produção de TXA<sub>2</sub>, o 11-dihidro tromboxano B<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub>). As amostras de sangue foram utilizadas para investigar polimorfismos da ciclooxigenase-1 e da glicoproteína IIIa, para a contagem de plaquetas, tipagem dos grupos sanguíneos “O” e “não-O”, dosagem de colesterol e frações, dímero-D e de proteína C reativa ultra sensível. O grupo de estudo foi composto por 81 participantes, com predominância do sexo feminino (71%) e média de idade de 57,39±9,8 anos. A mediana das dosagens de 11-dhTXB<sub>2</sub> nas amostras colhidas antes do uso de AAS foi de 179pg/mg creatinina e nas amostras colhidas após 15 dias de uso do medicamento, a mediana foi de 51pg/mg creatinina. A maioria dos pacientes (86%) apresentou resposta insatisfatória ao uso de AAS não tendo apresentado a redução mínima desejável de 90% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário. Pela análise de regressão logística foi encontrada associação entre a variável “Índice de Massa Corporal” (IMC) e a redução dos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub> durante uso de AAS. Entre os pacientes com IMC igual ou superior a 26kg/m<sup>2</sup> foi encontrado maior número de pacientes com redução igual ou superior a 50% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, sendo que esta diferença foi significativa quando comparado aos pacientes com IMC até 25kg/m<sup>2</sup> (p=0,010). Para as outras variáveis (polimorfismos da ciclooxigenase-1 e da glicoproteína IIIa, contagem de plaquetas, tipagem sanguínea em grupo “O” e “não-O”, dosagem de colesterol e frações, dímero-D e de proteína C reativa ultra sensível) não foi encontrada diferença

significativa em relação à redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub>. Apesar do número limitado de participantes neste estudo, os resultados indicam que os pacientes diabéticos responderam de forma variada e insatisfatória ao uso de AAS, não sugerindo diminuição de risco de doenças aterotrombóticas. Os dados analisados em conjunto corroboram os recentes relatos da literatura que mostram que, na prevenção primária, alguns pacientes diabéticos não se beneficiam do efeito do AAS como inibidor da síntese de TXA<sub>2</sub>.

**Unitermos:** ácido acetilsalicílico, tromboxano, plaquetas, diabetes mellitus 2.



## ABSTRACT

Acetylsalicylic acid (ASA) is the antiplatelet agent mostly used because it inactivates the enzyme cyclo-oxygenase-1, preventing the production of thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). This study was delineated in order to investigate the effect of ASA on the inhibition of TXA<sub>2</sub>, in diabetic patients taking ASA daily, to prevent the occurrence of atherothrombotic event. The study group was constituted of patients who attended the diabetes mellitus 2 outpatient clinic of the “*Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte*”. During the study, two samples of urine and blood were obtained from each patient. The first one was collected before starting use of ASA and the second one after fifteen days taking the drug. These samples were analyzed to determine the urinary levels of a TXA<sub>2</sub> metabolite (11-dehydro thromboxane B<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub>)). Laboratory tests also included determination of lipidic profile, glycated hemoglobin, D-dimer, C-reactive protein, platelets count and molecular analysis for both GPIIIa and COX-1 polymorphisms. The studied group had 81 members, with female predominance (71%) and medium age of 57.39±9.8 years. Patients’ median value for urinary 11-dhTXB<sub>2</sub> before ASA intake was 179.00 pg/mg creatinine. After 15 days taking ASA they had median of 51.00 pg/mg creatinine. There was significant difference between medians (p=0.00). Reduction of at least 90% on urinary 11-dhTXB<sub>2</sub> levels was not found in 86% of the patients. Body mass index ≥26 kg/m<sup>2</sup> presented a significant association with reduction of urinary 11-dhTXB<sub>2</sub> levels (p=0,010) as shown by multiple logistic regression model. Other clinical and laboratory variables (lipidic profile, glycated hemoglobin, D-dimer, C-reactive protein, platelets count and molecular analysis for both GPIIIa and COX-1 polymorphisms) showed no association. Even though this study had a small population size, the results achieved show that diabetic patients differ in their response to ASA and may not be protected against the occurrence of atherothrombotic events. Data analysis corroborate the results of meta-analyses published in 2009 and 2010 showing that, for primary prevention, some diabetic patients do not benefit from ASA effect as an inhibitor of TXA<sub>2</sub> synthesis.

**Key words:** acetylsalicylic acid, thromboxane, platelet, diabetes mellitus 2.

## LISTA DE FIGURAS

<b>2.1</b>	<b>Representação esquemática da cascata da coagulação e fibrinólise.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>Modelo da cascata da coagulação baseado em superfície celular <i>in vivo</i> adaptado de HOFFMAN (2003): fases de iniciação, de amplificação e de propagação.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3</b>	<b>Via do metabolismo do ácido araquidônico.....</b>	<b>39</b>
<b>2.4</b>	<b>Representação do gene da Ciclooxygenase 1 (COX-1) com as variantes genéticas mais comuns indicando as correspondentes alterações nos aminoácidos.....</b>	<b>41</b>
<b>2.5</b>	<b>Representação da molécula do ácido acetilsalicílico.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Porcentagem (%) de redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS.....</b>	<b>70</b>
<b>5.2</b>	<b>Distribuição dos valores de Hemoglobina A<sub>1c</sub> entre os pacientes (n=75).....</b>	<b>82</b>
<b>5.3</b>	<b>Identificação do polimorfismo do gene da Glicoproteína GPIIIa (PI<sup>A</sup>).....</b>	<b>89</b>
<b>5.4</b>	<b>Identificação do polimorfismo do gene da Ciclooxygenase 1 (COX-1).....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>5.1</b>	<b>Caracterização dos participantes do estudo (n=81).....</b>	<b>67</b>
<b>5.2</b>	<b>Perfil de uso de medicamentos pelos participantes do estudo (n=81).....</b>	<b>68</b>
<b>5.3</b>	<b>Valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81).....</b>	<b>69</b>
<b>5.4</b>	<b>Valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS de acordo com as características dos participantes.....</b>	<b>71</b>
<b>5.5</b>	<b>Análise estatística utilizando redução de <math>\geq 50\%</math> nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinários como variável resposta.....</b>	<b>74</b>
<b>5.6</b>	<b>Distribuição dos pacientes em relação à redução de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário por idade dos pacientes (n=81).....</b>	<b>76</b>
<b>5.7</b>	<b>Distribuição dos pacientes em relação à redução de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário por tempo de diagnóstico de DM2 (n=81).....</b>	<b>77</b>
<b>5.8</b>	<b>Modelo de Regressão Logística Múltipla utilizando redução de <math>\geq 50\%</math> nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinários como variável resposta.....</b>	<b>78</b>
<b>5.9</b>	<b>Valores de Proteína C Reativa ultra sensível (PCRus) antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81).....</b>	<b>78</b>
<b>5.10</b>	<b>Distribuição dos pacientes em relação à avaliação de risco de cardiovascular pelo valor de Proteína C Reativa ultra-sensível antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81).....</b>	<b>79</b>
<b>5.11</b>	<b>Avaliação do <i>status</i> de risco cardiovascular pelo valor de Proteína C Reativa ultra-sensível aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS em comparação ao <i>status</i> encontrado antes do uso de AAS (n=81).....</b>	<b>80</b>
<b>5.12</b>	<b>Distribuição dos pacientes em relação ao resultado de Proteína C Reativa ultra-sensível &lt; 3,00 mg/L e <math>\geq 3,00</math> mg/L antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81).....</b>	<b>80</b>
<b>5.13</b>	<b>Distribuição dos pacientes em relação à redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e valores de Proteína C Reativa ultra-sensível (PCRus) (n=81).....</b>	<b>81</b>

<b>5.14 Resultados das análises de dímero-D encontrados para as amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81).....</b>	<b>83</b>
<b>5.15 Medianas dos valores de dímero-D encontrados nas amostras colhidas aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS analisadas em relação à redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário (n=81).....</b>	<b>84</b>
<b>5.16 Correlação entre os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e dímero-D (Di-D) antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS.....</b>	<b>85</b>
<b>5.17 Correlação entre os níveis de dímero-D antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS e hemoglobina glicada (HbA<sub>1C</sub>).....</b>	<b>85</b>
<b>5. 18 Distribuição dos pacientes em relação à redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e número de plaquetas (n=81).....</b>	<b>86</b>
<b>5.19 Medianas dos valores de dímero-D das amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS de acordo com o grupo sanguíneo (“O” x “não-O”) dos pacientes.....</b>	<b>87</b>
<b>5.20 Correlação entre os níveis de dímero-D antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS para cada grupo sanguíneo dos pacientes (“O” e “não-O”).....</b>	<b>87</b>
<b>5.21 Perfil lipídico dos pacientes.....</b>	<b>88</b>
<b>5.22 Polimorfismo da Glicoproteína GPIIIa (PI<sup>A</sup>) (n= 81).....</b>	<b>89</b>
<b>5.23 Polimorfismo da Ciclooxygenase 1 (COX-1) (n= 81).....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11-dhTXB <sub>2</sub>	11-dihidro tromboxano B <sub>2</sub>
15-HETE	Ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
ADA	Associação Americana de Diabetes
ADP	Difosfato de adenosina
AG	Ácido gentísico
AGU	Ácido gentisúrico
AH	Ácido hipúrico
AHH	Ácido salicílico
AS	Ácido salicílico
ASG	Salicil acil glicuronato
AT	Antitrombina
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
COX-3	Ciclooxigenase 3
Di-D	Dímero-D
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPCR	Receptor endotelial de proteína C
F1+2	Fragmento 1+2 da protrombina
FPA	Fibrinopeptídeo A

FPB	Fibrinopeptídeo B
FV	Fator V
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
FVIII	Fator VIII
FVIIIa	Fator VIII ativado
FIX	Fator IX
FIXa	Fator IX ativado
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
FXIII	Fator XIII
FXIIIa	Fator XIII ativado
FT	Fator tecidual
FvW	Fator von Willebrand
GP Ib	Glicoproteína Ib
GPIIb	Glicoproteína IIb
GP IIIa	Glicoproteína IIIa
GP VI	Glicoproteína VI
HbA	Hemoglobina A
HbA <sub>1c</sub>	Hemoglobina glicada
<i>HR</i>	<i>Hazard Ratio</i>
IECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corporal

OR	<i>Odds Ratio</i>
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PAR	Receptor protease ativado
Pb	Pares de bases
PC	Proteína C
PCa	Sistema da proteína C ativada
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Polimerase chain reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PCRus	Proteína C Reativa ultra-sensível
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina I <sub>2</sub>
PF4	Fator plaquetário 4
PS	Proteína S
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SER	Serina
TAFI	Inibidor de fibrinólise ativado pela trombina
TAT	Complexo trombina-antitrombina
TFPI	Inibidor da via do fator tissular
TM	Trombomodulina
t-PA	Ativador de plasminogênio do tipo tecidual
TX	Tromboxano
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Tromboxano B <sub>2</sub>
u-PA	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase
VAL	Valina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Diabetes mellitus.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Trombose arterial.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Hemostasia.....</b>	<b>26</b>
<b><u>2.3.1 Coagulação.....</u></b>	<b>26</b>
<b><u>2.3.2 Fibrinólise.....</u></b>	<b>29</b>
<b><u>2.3.3 Grupo sanguíneo ABO e coagulação.....</u></b>	<b>31</b>
<b><u>2.3.4 Anticoagulação natural.....</u></b>	<b>31</b>
<b>2.4 Células endoteliais.....</b>	<b>32</b>
<b>2.5 Plaquetas.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6 Tromboxanos.....</b>	<b>37</b>
<b>2.7 Ciclooxigenases.....</b>	<b>39</b>
<b>2.8 Ácido acetilsalicílico.....</b>	<b>41</b>
<b>2.8.1 <u>Falha no tratamento com o ácido acetilsalicílico.....</u></b>	<b>44</b>
<b>2.8.2 <u>Prevalência da falha no tratamento com o ácido acetilsalicílico .....</u></b>	<b>48</b>
<b>2.8.3 <u>Mecanismos de falha no tratamento com o ácido acetilsalicílico.....</u></b>	<b>49</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>52</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>



4.1 Delineamento do estudo.....	53
4.2 Critérios de inclusão.....	53
4.3 Critérios de exclusão.....	54
4.4 Casuística.....	54
4.5 Variáveis descritivas.....	56
4.6 Variáveis analíticas.....	57
4.7 Amostras biológicas.....	57
4.8 Métodos.....	58
4.8.1 <u>Marcador da produção de Tromboxano A<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub> urinário)</u> .....	58
4.8.2 <u>Marcador de estado inflamatório (PCRus)</u> .....	60
4.8.3 <u>Marcador de adesão ao tratamento (metabólitos do AAS)</u> .....	60
4.8.4 <u>Marcador de controle glicêmico (HbA<sub>1c</sub>)</u> .....	61
4.8.5 <u>Marcador de fibrinólise (dímero-D)</u> .....	61
4.8.6 <u>Contagem de plaquetas</u> .....	62
4.8.7 <u>Classificação de grupo sanguíneo</u> .....	62
4.8.8 <u>Determinação do colesterol total e fracionado</u> .....	62
4.8.8.1 <u>Colesterol total</u> .....	62
4.8.8.2 <u>Colesterol HDL</u> .....	63
4.8.8.3 <u>Colesterol LDL</u> .....	63
4.8.8.4 <u>Triglicérides</u> .....	63
4.8.9 <u>Estudo do polimorfismo do gene da GPIIb (PI<sup>A</sup>)</u> .....	64
4.8.10 <u>Estudo do polimorfismo do gene da COX-1</u> .....	64
4.9 Análise estatística.....	65

<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Perfil dos participantes do estudo.....</b>	<b>67</b>
<b>5.2 Marcador da produção de Tromboxano A<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub> urinário).....</b>	<b>69</b>
<b>5.3 Marcador de estado inflamatório (PCRus).....</b>	<b>78</b>
<b>5.4 Marcador de adesão ao tratamento (metabólitos do AAS).....</b>	<b>81</b>
<b>5.5 Parâmetros bioquímicos, hematológicos e moleculares.....</b>	<b>82</b>
<b>5.5.1 <u>Marcador de controle glicêmico (HbA<sub>1c</sub>).....</u></b>	<b>82</b>
<b>5.5.2 <u>Marcador de fibrinólise (dímero-D).....</u></b>	<b>83</b>
<b>5.5.3 <u>Contagem de plaquetas.....</u></b>	<b>85</b>
<b>5.5.4 <u>Classificação de grupo sanguíneo.....</u></b>	<b>86</b>
<b>5.5.5 <u>Determinação do colesterol total e fracionado.....</u></b>	<b>88</b>
<b>5.5.6 <u>Estudo do polimorfismo do gene da GP IIIa (PI<sup>A</sup>).....</u></b>	<b>88</b>
<b>5.5.7 <u>Estudo do polimorfismo do gene da COX-1.....</u></b>	<b>90</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>6.1 Perfil dos participantes do estudo.....</b>	<b>92</b>
<b>6.2 Marcador da produção de Tromboxano A<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub> urinário).....</b>	<b>100</b>
<b>6.3 Marcador de estado inflamatório (PCRus).....</b>	<b>102</b>
<b>6.4 Marcador de adesão ao tratamento (metabólitos do AAS).....</b>	<b>103</b>
<b>6.5 Parâmetros bioquímicos, hematológicos e moleculares.....</b>	<b>105</b>
<b>6.5.1 <u>Marcador de controle glicêmico (HbA<sub>1c</sub>).....</u></b>	<b>105</b>
<b>6.5.2 <u>Marcador de fibrinólise (dímero-D).....</u></b>	<b>106</b>
<b>6.5.3 <u>Contagem de plaquetas.....</u></b>	<b>107</b>
<b>6.5.4 <u>Classificação de grupo sanguíneo.....</u></b>	<b>107</b>

<b><u>6.5.5 Determinação do colesterol total e fracionado</u></b> .....	109
<b><u>6.5.6 Estudo do polimorfismo do gene da GPIIIa (P1<sup>A</sup>)</u></b> .....	110
<b><u>6.5.7 Estudo do polimorfismo do gene da COX-1</u></b> .....	111
<b>6.7 Considerações finais</b> .....	112
<b>6.8 Perspectivas para a prevenção de evento aterotrombótico em pacientes diabéticos</b> .....	113
<b>7 Conclusões</b> .....	115
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	116
<b>ANEXO 1 - Parecer COEP UFMG</b> .....	126
<b>ANEXO 2 - Parecer CEP Santa Casa</b> .....	127
<b>APÊNDICE A - Ficha clínica</b> .....	128
<b>APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido</b> .....	131
<b>APÊNDICE C - Protocolo para extração de DNA</b> .....	133
<b>APÊNDICE D - Preparo de reagentes</b> .....	135
<b>APÊNDICE E - Protocolo para estudo do polimorfismo da GPIIIa</b> .....	139
<b>APÊNDICE F - Protocolo para estudo do polimorfismo da COX-1</b> .....	141

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico com alta prevalência. Os pacientes acometidos por esta alteração metabólica possuem maior risco de trombose arterial, pois apresentam quadro de hipercoagulabilidade. Em 2007, o ácido acetilsalicílico (AAS) foi recomendado pela *American Diabetes Association (ADA)* e pela *American Heart Association (AHA)* como medicamento para prevenção primária de evento aterotrombótico em pacientes diabéticos com risco aumentado de evento cardiovascular (BUSE et al., 2007).

As plaquetas desempenham importante papel no desenvolvimento da doença aterotrombótica e o ácido acetilsalicílico inibe a síntese de tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>), que é um potente promotor da agregação plaquetária (COOK, 2005). A quantidade de 11 dihidro tromboxano B<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub>), metabólito estável do TXA<sub>2</sub>, presente na urina pode indicar o nível de inibição da geração de TXA<sub>2</sub> e da ativação plaquetária (CATELLA et al., 1987; EIKELBOOM et al., 2002). Quantidades elevadas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário indicam inibição incompleta da síntese de TXA<sub>2</sub> e foram associadas a risco aumentado de eventos cardiovasculares (EIKELBOOM et al., 2008).

Estudos recentes sugerem que, na prevenção primária, alguns pacientes diabéticos não se beneficiam do efeito do AAS como inibidor da síntese de TXA<sub>2</sub>. Estudos de metanálise do “*Antithrombotic Trialist’ Collaboration*” (2002) e de BAIGENT et al. (2009) mostraram que baixas doses de AAS utilizadas na prevenção primária de eventos vasculares não tiveram o mesmo efeito benéfico obtido quando o objetivo era a prevenção secundária. Outro estudo de metanálise realizado por Zhang et al. (2010) revelou que o uso de AAS em pacientes diabéticos para prevenção primária não reduziu significativamente o risco de eventos cardiovasculares. No entanto, o “*Fremantle Diabetes Study*” concluiu que o uso regular de AAS em baixas doses na prevenção primária pode reduzir mortalidade por doença cardiovascular em pacientes com DM2 (ONG et al., 2010). A existência de estudos com resultados conflitantes levou a *American Diabetes Association* e a *American Heart Association* a reunir um grupo de especialistas para revisar, sintetizar e publicar as evidências

dos benefícios e riscos do uso de AAS, bem como as orientações para seu emprego na prevenção primária de eventos cardiovasculares em pacientes diabéticos (PIGNONE et al., 2010).

Considerando que, apesar de todas as controvérsias, o AAS continua a ser prescrito para milhares de pacientes diabéticos no Brasil, foi desenvolvido este estudo para investigar a resposta ao AAS de pacientes diabéticos de nossa região.

Com tantas questões a serem esclarecidas, entende-se que seja de grande relevância o desenvolvimento de um estudo que resulte em mais conhecimento do efeito do AAS sobre a ativação plaquetária. As doenças que culminam com um evento trombótico têm sido amplamente estudadas, entretanto, os métodos de prevenção primária e secundária merecem estudos adicionais que poderão indicar as estratégias profiláticas ou de controle mais eficazes.

Diante da relevância do assunto e das indagações ora existentes, o presente estudo buscou entender melhor o efeito do AAS em pacientes com DM2, pois este é um distúrbio multifatorial que quase sempre coexiste com uma gama de outras alterações clínicas potencialmente desencadeadoras de um estado de hipercoagulabilidade. Neste estudo, buscou-se investigar a resposta ao uso de AAS apresentada por uma amostra de pacientes com DM2 atendidos na Santa Casa de Belo Horizonte. Níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub>, utilizados na avaliação do efeito do AAS, foram analisados em função de diferentes aspectos clínicos/laboratoriais apresentados pelos pacientes, tais como níveis pressóricos, colesterol, hemoglobina glicada, proteína C reativa ultra sensível (PCRus), dímero-D, número de plaquetas e grupo sanguíneo, além de polimorfismos da ciclooxigenase 1 (COX-1) e glicoproteína GPIIIa. À luz do conhecimento de que os pacientes diferem quanto às características citadas acima e de que estas podem afetar a resposta ao AAS, a principal motivação deste estudo consistiu na hipótese de que diferentes pacientes podem apresentar respostas distintas ao uso de AAS, impactando desfavoravelmente a proteção desejada contra eventos cardiovasculares.

Diante do exposto acima, o presente estudo buscou-se responder alguns importantes questionamentos, a saber:

- Pacientes com diabetes mellitus tipo 2 em uso de AAS respondem de forma semelhante quando avaliados mediante os níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub>?
- O efeito do AAS sobre os níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub> é influenciado por alguma variável clínica ou molecular?
- São os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> observados nos pacientes do presente estudo consistentes com efeito protetor contra eventos trombóticos ou corroboram os achados de metanálises publicadas em 2009 e 2010?
- O uso de AAS nas condições do presente estudo pode ser indicativo de redução de risco de doença cardiovascular com base nos valores de PCRus?
- Indivíduos de grupos sanguíneos “não-O” são potencialmente mais hipercoaguláveis. Dessa forma, a redução nos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub> destes indivíduos seria diferente daquela dos pacientes do grupo “O”? Em outras palavras, o grupo sanguíneo pode influenciar a resposta ao AAS medida pela redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário?

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante da deficiência na secreção de insulina, do comprometimento da ação da insulina ou ambas. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a danos em longo prazo, levando à disfunção e falência de vários órgãos, principalmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2006).

O diagnóstico de diabetes mellitus é feito segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA): valor de hemoglobina glicada ( $HbA_{1C}$ )  $\geq 6,5\%$  (teste realizado em laboratório que utiliza método certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* e padronizado com teste do *Diabetes Control and Complication Trial*), glicemia após oito horas de jejum com resultado igual ou superior a 126 mg/dL; glicemia aleatória (feita a qualquer hora) igual ou superior a 200 mg/dL na presença de sintomas ou crise hiperglicêmica e/ou teste de tolerância à glicose após sobrecarga com 75g de glicose com valor igual ou superior a 200 mg/dL aos 120 minutos (ADA, 2010 a). Após o diagnóstico de diabetes, a ADA recomenda que o alvo do tratamento seja alcançar valor de hemoglobina glicada menor ou em torno de 7% (ADA, 2010 b).

A prevalência de DM para todas as faixas etárias foi avaliada em 2,8% em 2000 e 4,4% para 2030, indicando que o número de pessoas com idade igual ou superior a vinte anos acometidas pela doença deverá passar de 171 milhões em 2000 para 366 milhões em 2030. Se a prevalência de obesidade aumentar, é provável que estes números reflitam uma subavaliação da prevalência de DM no mundo (WILD et al., 2004).

A grande maioria dos casos de diabetes pode ser classificada em uma de duas amplas categorias: diabetes tipo 1 (DM1), caracterizada pela destruição auto-imune das células beta do pâncreas resultando na deficiência absoluta de secreção de

insulina e diabetes tipo 2 (DM2), causada por uma combinação de resistência à ação da insulina e resposta compensatória inadequada da secreção de insulina (ADA, 2006).

A insulina é um hormônio regulador da concentração de glicose no sangue que também promove o armazenamento de energia na forma de gordura. Esse hormônio estimula a lipogênese, a síntese de glicogênio e de proteínas e também inibe a lipólise, a glicogenólise e a quebra de proteínas. A deficiência de insulina ou resistência a este hormônio tem como consequência o aumento dos níveis sanguíneos de glicose e lípidos (SALTIEL e KAHN, 2001).

A hemoglobina glicada é o produto de uma ligação não enzimática e permanente entre açúcares redutores como a glicose e a hemoglobina A (HbA). A HbA é a forma principal e nativa da hemoglobina, sendo que a HbA<sub>0</sub> é o principal componente da HbA e corresponde à fração não glicada da HbA. A HbA<sub>1</sub> total corresponde a formas de HbA carregadas mais negativamente devido à adição de glicose e outros carboidratos. Existem vários subtipos de HbA<sub>1</sub> cromatograficamente distintos, tais como HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub>, HbA<sub>1b</sub> e HbA<sub>1c</sub>. A fração HbA<sub>1c</sub> é a que se refere à hemoglobina glicada propriamente dita, cujo terminal valina da cadeia beta está ligado à glicose por meio de uma ligação estável e irreversível. Níveis de HbA<sub>1c</sub> acima de 7,0% estão associados a maior risco de complicações crônicas no paciente diabético (NETTO et al., 2009).

O paciente diabético apresenta alterações no metabolismo que são responsáveis por distúrbios nas funções endoteliais e plaquetárias, causando aterosclerose e subsequente aumento no risco de eventos cardiovasculares. O risco de doença cardiovascular em pacientes com DM é duas a quatro vezes maior quando comparados com indivíduos sem DM pareados por idade e sexo. Este aumento de risco persiste mesmo quando os fatores tradicionais (hipertensão, tabagismo, hipercolesterolemia e sedentarismo) são controlados. Isto sugere que outros fatores, como o estado protrombótico, possam estar envolvidos nessa situação, formando trombos oclusivos nas placas ateroscleróticas vulneráveis (NATARAJAN et al., 2008).



## 2.2 Trombose arterial

A trombose arterial é uma complicação aguda da aterosclerose que se desenvolve na superfície de uma placa ateromatosa rompida em consequência de erosão endotelial, e que libera proteínas trombogênicas que levam à adesão, ativação e subsequente agregação das plaquetas. Nesse local ocorre a formação de um trombo que pode obstruir parcialmente a artéria e, caso venha a se expandir, pode ocluir totalmente a artéria e levar o paciente a óbito. A aterotrombose é responsável por redução de 30% na expectativa de vida do paciente diabético e causa 80% das mortes de pacientes diabéticos (MOREL et al., 2010). O processo aterotrombótico está associado a processo inflamatório e os níveis de proteína C reativa ultrasensível (PCRus) têm sido utilizados como marcadores inflamatórios, sendo que seu aumento tem sido considerado como preditor de eventos cardiovasculares. No paciente diabético, já se sabe que mesmo indivíduos com a doença bem controlada e sem complicações macrovasculares apresentam níveis elevados de PCRus (MOUSSAVI et al., 2004).

A proteína C reativa é um marcador de inflamação, produzido no fígado e nas placas ateroscleróticas pelas células vasculares em resposta a certos estímulos inflamatórios, que incluem Interleucina-6, sendo capaz de se ligar ao poliosídeo C na parede celular do *Streptococcus pneumoniae* (MONTECUCCO e MACH, 2008). A proteína C reativa liga-se não apenas aos poliosídeos presentes em muitas bactérias, fungos e protozoários parasitas, mas também à fosforilcolina, fosfatidilcolinas e ácido nucléico. Uma vez formado o complexo, a proteína C reativa torna-se um ativador da via clássica do complemento. Como os anticorpos, a proteína C reativa pode iniciar a opsonização, fagocitose e lise das células invasoras. Talvez seu principal papel seja reconhecer substâncias autógenas potencialmente tóxicas, liberadas por tecidos danificados, ligar-se a elas e removê-las do sangue. A proteína C reativa exhibe aumentos intensos de concentração após o infarto do miocárdio, trauma, infecções, cirurgia ou proliferação neoplásica. O aumento ocorre dentro de 24 a 48 horas, e o nível pode atingir até 2000 vezes o valor de referência (Silverman, 1998).

## 2.3 Hemostasia

A manutenção do fluxo sanguíneo é essencial para a preservação da vida. A perda deste fluxo pode ocorrer por falha no coração que bombeia o sangue, perda de sangue originada em hemorragia ou obstrução dos vasos causada por trombose. A hemostasia consiste em um processo fisiológico em que substâncias procoagulantes e anticoagulantes interagem para evitar a ocorrência de hemorragia ou trombose. O processo hemostático depende da interação complexa e harmônica entre o endotélio vascular e os componentes intravasculares que incluem as plaquetas, as proteínas plasmáticas da coagulação e da fibrinólise e os anticoagulantes naturais (BICK & MURANO, 2002).

### 2.3.1 Coagulação

Em 1964, Macfarlane, Davie & Ratnoff propuseram um conceito de coagulação conhecido como “cascata da coagulação”, baseado em uma sequência de etapas em que um fator da coagulação levava à ativação de outro até a formação de trombina. O aperfeiçoamento do modelo passou a considerar que alguns fatores são pró-enzimas que podem ser convertidas em enzimas ativas, e outros são co-fatores sem atividade enzimática. Nesse modelo, o processo de coagulação inicia-se com a ativação de duas vias distintas denominadas via intrínseca e via extrínseca, que ativam a via comum iniciada com a ativação do fator X. Este fator ativado (Xa) forma um complexo com o fator Va (ativado por traços de trombina), fosfolípidos e íons  $\text{Ca}^{2+}$ , denominado protrombinase, o qual age sobre a protrombina que se converte em trombina. Esta age sobre o fibrinogênio, formando fibrina que, junto com as plaquetas, origina o tampão hemostático (**Figura 2.1**). Várias etapas deste processo são dependentes de fosfolípidos e cálcio (DAVIE, 2003; HOFFMAN & MONROE, 2007).

Ao ser acionado o complexo protrombinase (FXa-FVa-fosfolípidos e  $\text{Ca}^{2+}$ ), são formados quatro tipos de peptídeos que podem ser usados para avaliar um possível

estado de hipercoagulabilidade. São estes: o fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), formado quando o complexo protrombinase age sobre a protrombina; o complexo trombina-antitrombina (TAT) que surge quando a antitrombina neutraliza a trombina, impedindo sua ação sobre o fibrinogênio e os fibrinopeptídeos A (FPA) e B (FPB) formados quando o fibrinogênio se transforma em fibrina.

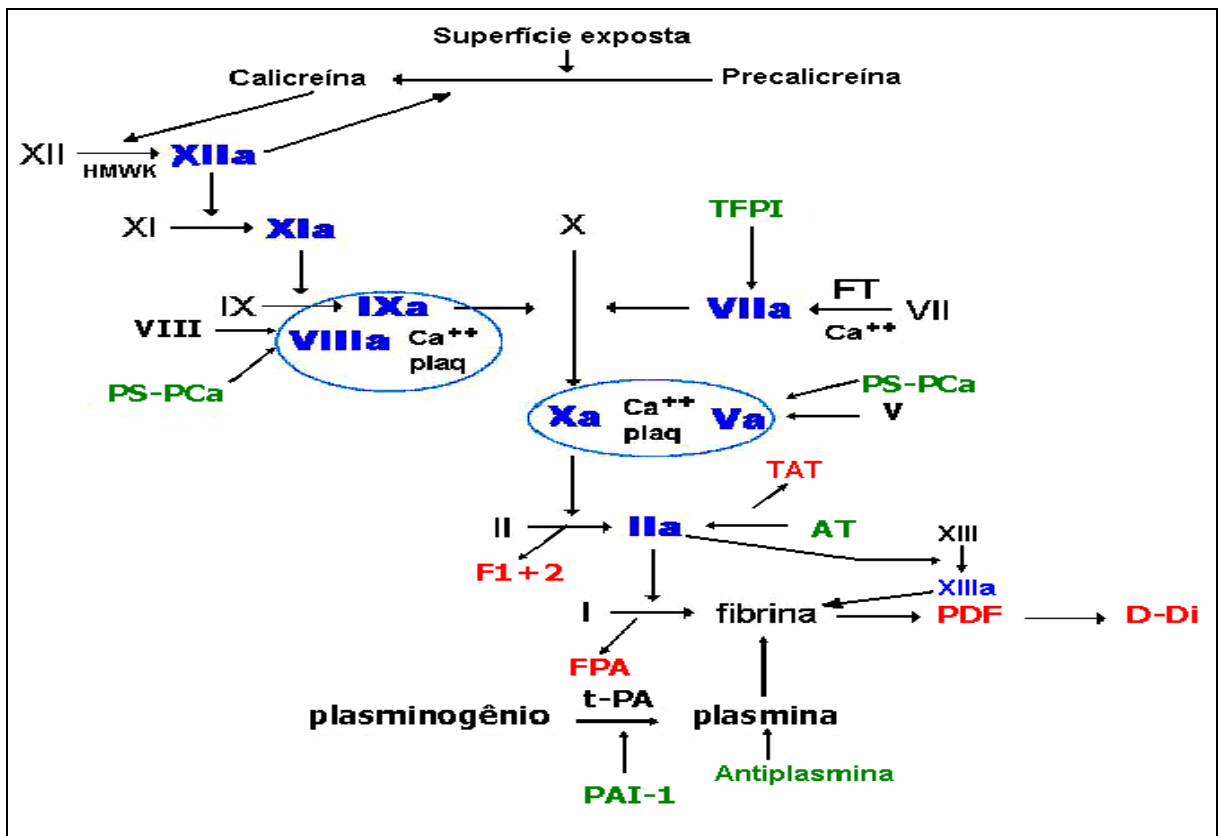
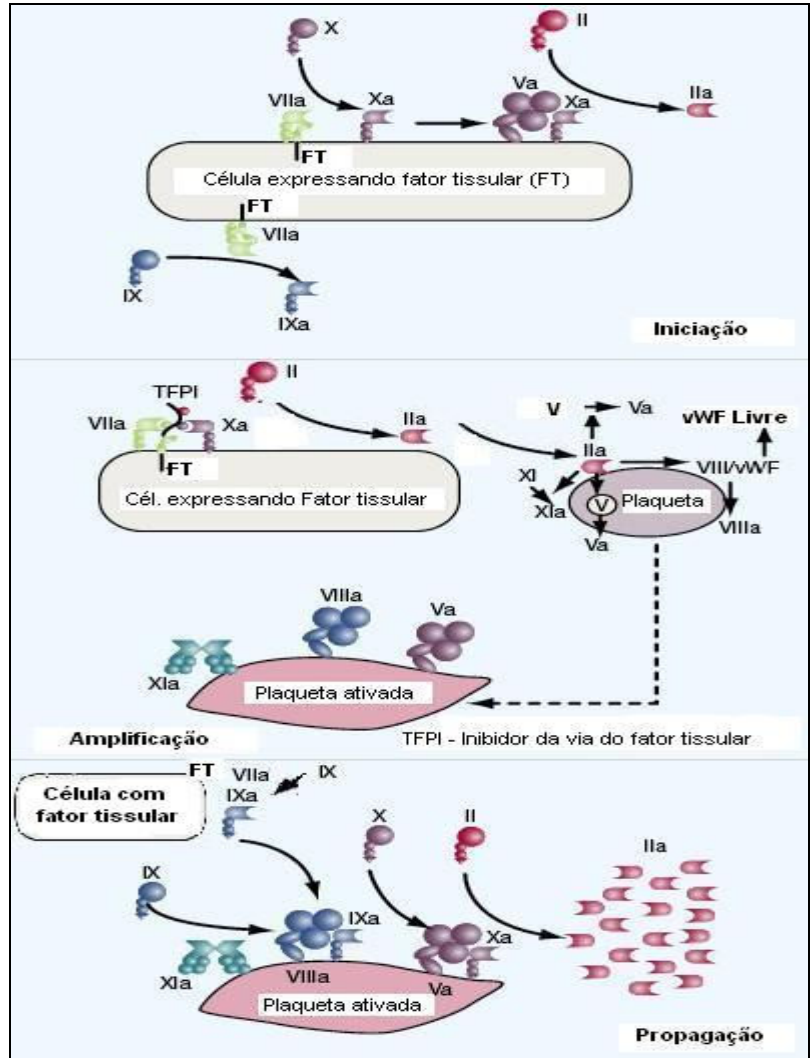


Figura 2.1 - Representação esquemática da cascata de coagulação e fibrinólise.

Com o avanço dos estudos, o modelo tornou-se mais refinado, reconhecendo o papel fundamental desempenhado por células no direcionamento e controle do processo da coagulação. A hemostasia normal não pode ocorrer na ausência de plaquetas e fator tecidual (FT), elemento crucial no desencadeamento da coagulação, cuja atividade normalmente está associada às células. Estas, na sua diversidade, expressam níveis diferentes de proteínas pró e anticoagulantes, além de diferentes receptores para os componentes da hemostasia. Estas observações

permitem atribuir às células um importante papel no direcionamento da hemostasia in vivo (HOFFMAN & MONROE, 2007) (**Figura 2.2**).



**Figura 2.2 - Modelo da cascata da coagulação baseado em superfície celular in vivo adaptado de HOFFMAN (2003): fases de iniciação, de amplificação e de propagação.**

Quando ocorre ruptura do vaso sanguíneo ou exposição do endotélio vascular, colágeno e fator tissular são expostos ao sangue circulante que interage rapidamente com a parede endotelial para limitar o sangramento e iniciar o reparo do local lesado. O colágeno exposto provoca o acúmulo e a ativação das plaquetas, enquanto o fator tissular inicia a geração de trombina que não apenas converte fibrinogênio em fibrina, como também ativa as plaquetas. Este mecanismo de coagulação sanguínea ocorre em três fases que se sobrepõem: início da coagulação (ocorre numa superfície celular onde o fator tissular é exposto), propagação da

coagulação (plaquetas e fatores ativados produzem trombina) e finalização da resposta pró-coagulante (acontece na superfície plaquetária, ocorrendo a produção de grande quantidade de trombina e de fibrina) (MANN et al., 2009).

A dinâmica do processo de coagulação é regulada por três complexos procoagulantes proteolíticos ligados a membranas celulares, que se juntam no local da lesão vascular em plaquetas, endotélio lesado e tecido subvascular. São estes: complexo extrínseco Fator Xase (FT - Fator VII ativado), complexo intrínseco Fator Xase (Fator VIII ativado – Fator IX ativado) e complexo protrombinase (Fator V ativado – Fator X ativado) (MANN et al., 2009).

O modelo de coagulação baseado em células mostra que as duas vias, extrínseca e intrínseca, não são redundantes. A primeira consiste no complexo Fator VII ativado / FT agindo com o complexo Fator X ativado (FXa) / Fator V ativado (FVa), na célula que expressa FT, para iniciar e amplificar a coagulação. A segunda consiste do Fator XI ativado agindo com os fatores VIII ativado / IX ativado e X ativado / V ativado na superfície da plaqueta ativada, para permitir a erupção de trombina que induz a formação e estabilização do coágulo de fibrina e plaquetas (HOFFMAN & MONROE, 2007).

### **2.3.2 Fibrinólise**

A eficiência da hemostasia depende das reações procoagulantes bem como da fibrinólise. O processo fibrinolítico tem como objetivo remover o coágulo depois da cicatrização da lesão vascular e também os coágulos intravasculares, potenciais causadores de trombose.

Ao mesmo tempo em que o coágulo de fibrina é formado, o sistema fibrinolítico é ativado para rompê-lo por meio da plasmina, que quebra a fibrina em produtos solúveis de degradação. O precursor da plasmina é o plasminogênio que é ativado pelo ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e pelo ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). Ambos têm alta especificidade de ligação com o plasminogênio e promovem hidrólise de uma única ponte peptídica (Arg<sup>560</sup>-

Val<sup>561</sup>) formando a plasmina. O t-PA é liberado pelas células endoteliais por ação da trombina e da oclusão venosa, e se liga ao polímero de fibrina em formação, assim como o plasminogênio, que é ativado a plasmina. Esta quebra a fibrina em resíduos de lisina e arginina, com conseqüente dissolução do coágulo de fibrina. Entre os produtos formados na degradação da fibrina (PDF) está o dímero-D, cujos níveis plasmáticos permitem avaliar a função fibrinolítica. Níveis elevados de dímero-D permitem inferir que a formação de fibrina está exacerbada, caracterizando quadro de hipercoagulabilidade (FRANCO, 2001; HOFFMAN & MONROE, 2007).

A deposição intravascular de fibrina está associada ao desenvolvimento de aterosclerose, de forma que é necessário que o sistema fibrinolítico seja eficiente para que haja proteção contra doença aterosclerótica vascular crônica e trombose aguda. Níveis elevados de inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e diminuídos de plasminogênio estão associados ao aumento no risco de aterosclerose e trombose (XIAO et al, 1997; HUBER et al, 2001).

O dímero-D é um marcador de degradação da fibrina solúvel ou insolúvel, formado pela ação sequencial de três enzimas: trombina, fator XIIIa e plasmina. Os resultados das dosagens de dímero-D podem ser usados na avaliação inicial de pacientes com suspeita de trombose venosa profunda e/ou embolismo pulmonar devido ao seu alto valor preditivo negativo (ADAM et al., 2009). O dímero-D também tem sido estudado como marcador de hipercoagulabilidade, tendo sido relatada sua associação com a progressão da lesão microvascular e com microalbuminúria em pacientes diabéticos (Wakabayashi e Masuda, 2009).

O valor preditivo de níveis elevados de dímero-D tem sido endossado por evidências de que oferece indicação prognóstica para diversas condições além da trombose venosa, como coagulação intravascular disseminada, doença cardiovascular, doenças infecciosas e câncer (ADAM et al., 2009).

### **2.3.3 Grupo sanguíneo ABO e coagulação**

A associação entre grupo sanguíneo ABO e alterações na coagulação que resultam na formação de trombo venoso foi primeiro descrita por Jick et al. em 1969. Indivíduos pertencentes ao grupo O apresentam tendência ao sangramento, enquanto que aqueles do grupo A coagulam mais facilmente (JENKINS & O'DONNELL, 2006). Níveis mais elevados de fator VIII e FvW foram encontrados em indivíduos com classificação sanguínea de grupo “não-O” quando comparados aos indivíduos de grupo “O” (SOUSA et al. 2007) e pode ser uma das explicações para a maior ocorrência de trombose venosa profunda em pacientes com sangue classificado como do grupo “não-O” (JICK et al., 1969; MORELLI et al., 2005; JUKIC et al., 2009).

Paiva et al. (2009) estudaram os alelos A1, A2 e B do sistema sanguíneo ABO e encontraram associação independente entre os alelos A1 e A2 e tromboembolismo venoso. Estes pesquisadores constataram que os grupos sanguíneos A e B eram mais frequentes no grupo de pacientes com trombose venosa, enquanto que no grupo controle (sem trombose venosa) o grupo O era mais frequente.

### **2.3.4 Anticoagulação natural**

O êxito da hemostasia também depende do controle da coagulação, para que esta não seja excessiva ou desnecessária, evitando a oclusão parcial ou total do vaso. O controle da coagulação é feito pelos quatro inibidores fisiológicos da coagulação: inibidor da via do fator tissular (TFPI), antitrombina (AT), proteína C (PC) e proteína S (PS).

O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) é uma proteína produzida pelas células endoteliais. A antitrombina, que circula em concentrações elevadas (150 µg/mL), é o inibidor primário da trombina, além de neutralizar os fatores IXa, Xa e XIa, acelerar a dissociação do complexo FT/VIIa e impedir sua reassociação. A molécula de heparan sulfato, um glicosaminoglicano presente na membrana das células

endoteliais, e a heparina, um polissacarídeo linear, aceleram as reações catalisadas pela AT (FRANCO, 2001; TANAKA et al., 2009).

A proteína C, tendo a proteína S como cofator não enzimático potencializador, forma o sistema da Proteína C ativada (PCa). A PC, quando ligada ao seu receptor no endotélio (EPCR), é ativada após a ligação da trombina ao seu receptor endotelial chamado trombomodulina (TM). A PCa inibe a coagulação, clivando e inativando os fatores Va e VIIIa. A identificação deste sistema acrescentou uma função anticoagulante à trombina, pois sua ligação à TM endotelial é o evento-chave para ativação da via inibitória da PC (FRANCO, 2001). PCa é mais eficiente na inativação do FVa na superfície da célula endotelial do que na superfície das plaquetas, o que leva a supor que o objetivo primário deste sistema é impedir a geração de trombina em células endoteliais saudáveis (HOFFMAN, 2003).

## **2.4 Células endoteliais**

A parede vascular, com seu revestimento interno de endotélio, desempenha um papel muito importante na hemostasia, mantendo o vaso sanguíneo desobstruído. O endotélio íntegro contribui para a fluidez sanguínea por três mecanismos: prevenção da agregação plaquetária, ação anticoagulante e estimulação do sistema fibrinolítico. As células do endotélio sintetizam três trombo-reguladores: óxido nítrico, prostaciclina e ectonucleotidase CD39 que, juntos, atuam na defesa contra a formação de trombos (FURIE & FURIE, 2008).

O endotélio atenua a atividade plaquetária liberando prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que tem seu efeito ampliado pelo óxido nítrico. Ambos são vasodilatadores. Além disto, o endotélio libera ecto-ADPase que degrada difosfato de adenosina (ADP), um agonista da ativação plaquetária. Por outro lado, o endotélio ativado por inflamação apresenta uma resposta pró-coagulante pela síntese de fator tecidual, de fator de von Willebrand (FvW) e do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1). Grande parte do FvW é sintetizada pelas células endoteliais, sendo os dímeros secretados para o ambiente externo ao endotélio e o multímeros armazenados nos corpos



Weibel-Palade. O FvW participa da adesão das plaquetas ao endotélio e se associa ao Fator VIII, impedindo sua depuração (TANAKA et al., 2009).

## 2.5 Plaquetas

As plaquetas são pequenas células anucleadas que medem de 2 a 4 $\mu$ m de diâmetro e contêm dois tipos de grânulos ( $\alpha$  e densos), lisossomas, mitocôndria, retículo endoplasmático e RNA mensageiro (RNAm) derivado do megariócito, tendo condições de sintetizar algumas proteínas, uma função tipicamente nuclear que já foi detectada no citoplasma das plaquetas (DENIS et al., 2005). As plaquetas permanecem na circulação sanguínea de 7 a 10 dias, numa concentração de 150 a 400  $\times 10^3$ /mL, o que equivale a 70% do total de plaquetas presentes no organismo, pois 30% estão armazenadas no baço. São originadas do citoplasma de megacariócitos, as únicas células poliplóides hematopoiéticas, e são retiradas da circulação por células reticuloendoteliais do baço e do fígado (MICHELSON, 2003). As plaquetas possuem estrutura discóide complexa que está dividida em quatro zonas: periférica, sol-gel, organelas e sistema membranar.

A zona periférica inclui as membranas externa e interna, bem como o sistema canicular aberto que é responsável pela troca de moléculas com o meio externo. A membrana plaquetária é rica em glicoproteínas (GP) envolvidas com a adesão das plaquetas e com sua ativação. Na zona periférica também são encontrados os fosfolípidos de membrana que participam da coagulação e servem como substrato para a produção de ácido araquidônico (AA) que, sob ação de ciclooxygenase-1 (COX-1), irá formar tromboxano  $A_2$  (TXA $_2$ ), um agonista potente da agregação plaquetária e da vasoconstrição (CASTRO et al., 2006).

A zona sol-gel está abaixo da zona periférica e é composta de um citoesqueleto que sustenta a forma discóide da plaqueta e de um sistema contrátil que permite mudança da forma discóide, prolongamento dos pseudópodes, contração interna e liberação dos constituintes granulares (CASTRO et al., 2006).

A zona de organelas compreende os grânulos alfa, grânulos densos e componentes celulares como lisossomas e mitocôndria, que participam dos processos metabólicos da plaqueta. Os grânulos alfa contêm proteínas de adesão, fator von Willebrand, trombospondina, vitronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator IV plaquetário, fatores da coagulação como o fator IX e inibidor do ativador de plasminogênio. Os grânulos densos contêm trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), serotonina e cálcio. O sistema membranar inclui o sistema tubular denso, que concentra o cálcio responsável pelos eventos contráteis, e os sistemas enzimáticos envolvidos na síntese de prostaglandinas (CASTRO et al., 2006).

A membrana das plaquetas apresenta receptores especializados que ligam agonistas e outras moléculas. A maioria destes receptores é da família das integrinas. As integrinas participam da adesão e agregação plaquetária e da propagação da ativação, além de permitir sinalização bidirecional (de dentro para fora e de fora para dentro da plaqueta). Entre os receptores plaquetários que não são integrinas está a GP Ib, que está complexada com as GP IX e V, e a GP VI, principal receptor de colágeno indutor de ativação (JENNINGS, 2009).

A integrina plaquetária GP IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) é essencial para as interações plaquetas-proteínas no plasma. Esta é a integrina mais abundante na membrana plaquetária, variando de 50.000 a 80.000 cópias por plaqueta. A ligação do fibrinogênio aos receptores GP IIb/IIIa e a subsequente retração do coágulo, facilitada pelas ligações de GP IIb/IIIa do citoesqueleto plaquetário, auxiliam a consolidação do coágulo (JENNINGS, 2009). A subunidade  $\beta_3$  (GPIIIa) desta integrina da membrana plaquetária apresenta um polimorfismo na posição 33 Leu→Pro, resultante de uma única transição nucleotídica no gene GPIIIa ( $C^{155}\rightarrow T$ , M57482) e que é comumente conhecida como polimorfismo do antígeno plaqueta-específico  $PI^{A1/A2}$  (NEWMAN et al., 1989). Estudos feitos por MICHELSON et al., cujos resultados foram publicados em 2000, mostraram que homozigose para o alelo  $PI^{A2}$  está relacionada a maior reatividade plaquetária, com aumento da liberação do conteúdo dos grânulos alfa e ativação da GPIIb/IIIa. Indivíduos heterozigotos para este alelo apresentaram um consistente aumento da reatividade plaquetária, embora este fato não tenha alcançado significância estatística no estudo de MICHELSON et al. (2000).

A adesão plaquetária é primariamente mediada pelo colágeno, uma proteína de adesão que reúne as plaquetas por dois mecanismos: primeiro recruta FvW do plasma que por sua vez se liga à proteína de membrana GP Ib/V/IX; e segundo, por ligar diretamente dois receptores das plaquetas, integrina  $\alpha_2\beta_1$  e GP VI, que é receptor de colágeno. A GP VI é o principal agonista para o início da ativação plaquetária e liberação do conteúdo dos grânulos. A ativação plaquetária envolve múltiplos fatores. Entre os agonistas primários estão o colágeno (durante a adesão plaquetária) e a trombina, uma protease gerada em resposta ao fator tecidual exposto no local da lesão vascular. A trombina cliva os receptores ativados por protease (PAR) 1 e 4 na superfície plaquetária levando à liberação de difosfato de adenosina (ADP), serotonina e tromboxano  $A_2$ . Estes agonistas ativam outras plaquetas, amplificando os sinais para a formação do trombo. A liberação de ADP estimula a ativação das plaquetas por dois receptores de ADP:  $P_2Y_1$  e  $P_2Y_{12}$ . A GP IIb-IIIa, quando ativada, participa do recrutamento de plaquetas para o trombo bem como das interações entre plaquetas (FURIE & FURIE, 2008; JENNINGS, 2009).

A adesão plaquetária induz rápida transdução de sinal, que desencadeia uma sequência de fenômenos: ativação plaquetária, alterações do citoesqueleto associadas à mudança na conformação, expansão de pseudópodos, contração e secreção dos conteúdos granulares e ativação das integrinas que darão sustentação à adesão e subsequente agregação plaquetária via receptor GPIIb/IIIa. Este receptor de fibrinogênio participa da interação entre plaquetas, viabilizando a ligação de fibrinogênio ou FvW entre elas, o que permite a formação do agregado plaquetário (CASTRO et al., 2006).

A regulação negativa das plaquetas pelo óxido nítrico e pela prostaciclina impede a formação indevida de trombo. A ativação plaquetária também pode ser inibida por sinalização por meio da molécula de adesão PECAM-1, também conhecida como CD31. Esta molécula estaria relacionada à inibição da sinalização quinase-dependente, também atuando sobre a ativação plaquetária mediada por GPIb (JONES, et al., 2001; CICMIL et al., 2002).

As plaquetas também contribuem para a formação da placa aterosclerótica, fornecendo superfície de fosfolípides adequada e liberando P-selectina e FvW que estimulam o recrutamento de leucócitos. Estes contribuem para o processo

inflamatório local associado à aterosclerose. Além disto, os grânulos plaquetários contêm fatores de crescimento que contribuem para a proliferação celular na lesão aterosclerótica em expansão (JENNINGS, 2009). Quando uma plaqueta é ativada, são liberadas mais de 300 proteínas. Apenas uma pequena parte dessas já foi identificada, mas já se sabe que uma proporção significativa é composta por mediadores inflamatórios, como ligante CD40 (CD40L), P-selectina, interleucina -1 $\beta$  e fator plaquetário (STEINHUBL, 2007).

O CD40L é responsável pela estimulação de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas formadas pela ação da ciclooxigenase-2 (STEINHUBL, 2007). O tabagismo e DM2 estão associados à ativação plaquetária e aumento na liberação de CD40L (HARDING et al., 2004; SANTILLI et al., 2006). A interleucina -1 $\beta$  é um importante mediador da ativação das células endoteliais pelas plaquetas, levando-as a aumentar a liberação de citocinas e de moléculas que promovem a adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio (GAWAZ et al., 2005). O fator plaquetário 4 é liberado pelas plaquetas durante a ativação, induzindo a expressão de E-selectina pelas células endoteliais (YU et al., 2005).

De acordo com Stratmann & Tschoepe (2005), pacientes com DM2 possuem o complexo de regulação da atividade plaquetária alterado da seguinte forma:

- Aumento da reatividade e da adesão;
- Amplificação da ligação agonista- receptor;
- Aumento da capacidade de geração de prostanóides;
- Diminuição da capacidade de geração de óxido nítrico;
- Aumento da geração de espécies de oxigênio reativo;
- Resistência ao óxido nítrico e à prostaciclina;
- Aumento da mobilização citossólica de cálcio;
- Aumento do conteúdo dos grânulos alfa bem como da sua liberação;
- Aumento do volume plaquetário;

- Aumento do número de receptores GPIb e GPIIb/IIIa;
- Aumento da glicação das proteínas de membrana;
- Alteração da fluidez da membrana;
- Aumento da ligação de ligantes adesivos RGD - proteínas como fibrinogênio;
- Aumento do conteúdo e liberação de PAI-1.

Esta situação leva ao estado de hipercoagulabilidade, fibrinólise diminuída, redução da trombo-resistência endotelial e hiperreatividade plaquetária. Plaquetas ativadas liberam ácido araquidônico, que é rapidamente transformado em prostaglandinas e outros produtos da lipoxigenase que são os eicosanóides.

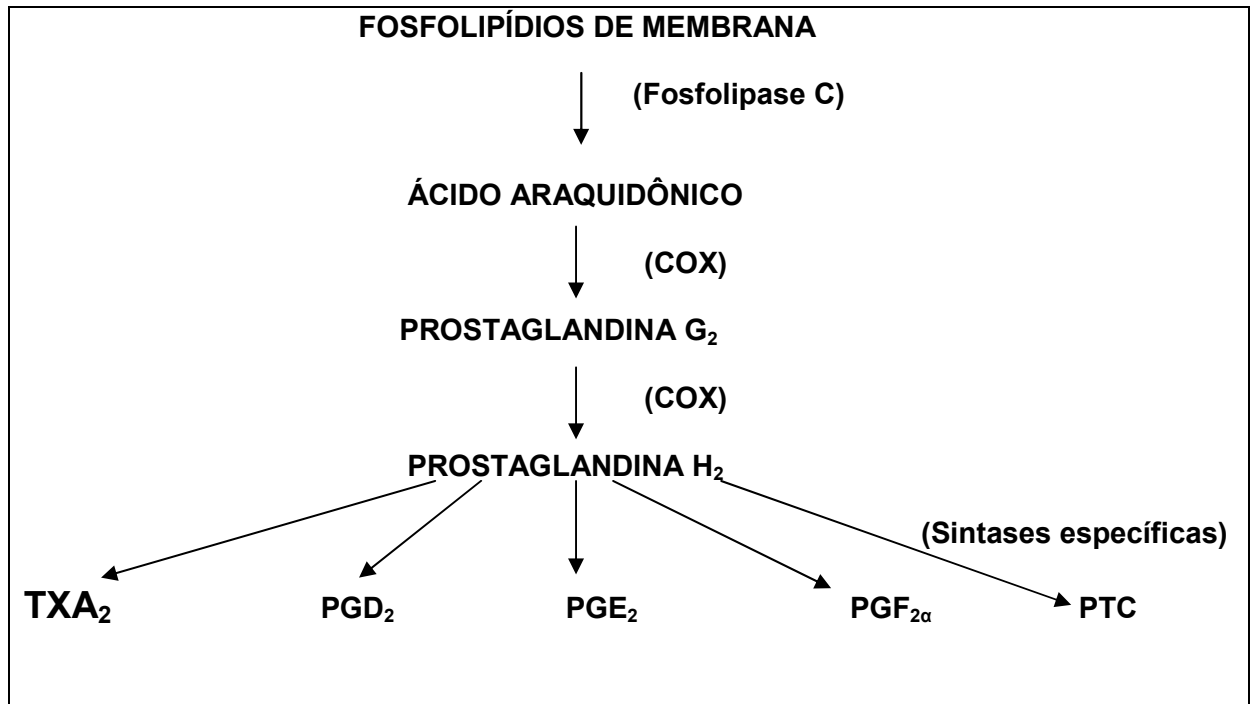
## 2.6 Tromboxanos

Os eicosanóides são mediadores lipídicos, derivados do ácido araquidônico, que possuem diversas funções biológicas (COOK, 2005). Entre eles estão os leucotrienos, as prostaglandinas, a prostaciclina e os tromboxanos. A prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) é sintetizada por células endoteliais, macrófagos, pulmões e rins. É um vasodilatador potente e inibe a agregação plaquetária. O eicosanóide tromboxano (TX) recebeu este nome porque induz agregação plaquetária (trombose). O tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) é sintetizado em grande quantidade por plaquetas, macrófagos, monócitos e pulmões, sendo um potente vasoconstritor, broncoconstritor e promotor de agregação plaquetária (COOK, 2005). O TXA<sub>2</sub> aumenta a expressão dos receptores de fibrinogênio na membrana plaquetária, e é liberado na circulação, onde se liga aos receptores de tromboxano na superfície de plaquetas próximas, ativando-as. O TXA<sub>2</sub> também age sinergicamente com outras substâncias liberadas pelas plaquetas ativadas como ADP, fibrinogênio e fator V, aumentando a ativação plaquetária (MASON et al., 2005).

A via do metabolismo do ácido araquidônico (AA) para a formação de tromboxanos está representada na **Figura 2.3**. A fosfolipase C é a enzima responsável pela liberação do ácido araquidônico dos fosfolípidios de membrana das plaquetas. A ciclooxigenase (prostaglandina H sintase) catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas  $G_2$  e  $H_2$ . A prostaglandina  $H_2$  é transformada em  $TXA_2$  pela ação da tromboxano sintase em plaquetas, macrófagos, monócitos e células pulmonares; em prostaciclina pela prostaciclina sintase nas células endoteliais e em prostaglandina E pela ação da prostaglandina E sintase em diversos tecidos (LEMAITRE et al., 2009).

O  $TXA_2$  é instável e se hidrolisa espontaneamente, formando  $TXB_2$  que é estável, porém inativo. Este é degradado por duas vias metabólicas principais que resultam na formação de 2,3-dinor- $TXB_2$  e 11-dihidro- $TXB_2$  (11-dh $TXB_2$ ). A formação de 11-dh $TXB_2$  envolve a dehidrogenação do grupamento álcool hemiacetal em C-11 pela 11-hidroxi tromboxano dehidrogenase, enquanto que o 2,3-dinor- $TXB_2$  é formado por  $\beta$ -oxidação. Ambos os metabólitos são igualmente formados, mas o 11-dh $TXB_2$  tem meia vida circulante maior que o 2,3-dinor- $TXB_2$  (45 X 15 minutos, aproximadamente) (PERNEBY et al., 1999).

Embora seja comum estimar os níveis de  $TXA_2$  pela medida do  $TXB_2$ , a maior parte do  $TXB_2$  medido no plasma ou urina é devido a ativação plaquetária *ex vivo* ou produção intra-renal, respectivamente. Além disto, as medidas de  $TXB_2$  estão mais sujeitas a erro, uma vez que a concentração normal de  $TXB_2$  circulante é extremamente baixa (1-2pg/ml) e altamente transitória ( $t_{1/2}$ = 5-7 minutos). Níveis urinários de 11-dh $TXB_2$  têm sido utilizados como indicadores da produção de  $TXA_2$  (CATELLA et al., 1987; EIKELBOOM et al., 2002)



**Figura 2.3 - Via do metabolismo do ácido araquidônico**

## 2.7 Ciclooxygenases

A ciclooxygenase-1 (COX-1), purificada em 1976 (HEMLER et al, 1976) e clonada em 1988, é a enzima responsável pela síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Em 1991 foi identificado o produto de um segundo gene com atividade COX, que foi denominado ciclooxygenase-2 (COX-2) (XIE et al., 1991). A COX-1 é uma isoforma expressa constitutivamente em tecidos, e participa do processo de homeostasia normal, enquanto que a expressão da COX-2 é induzida por citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, significando que age nas inflamações e no controle do crescimento celular (VANE et al, 1998).

As COX-1 e COX-2 são isoformas verdadeiras, uma vez que usam o mesmo substrato - o ácido araquidônico e catalisam as mesmas duas reações - oxidação do AA formando PGG<sub>2</sub> e subsequente redução a PGH<sub>2</sub>. As estruturas dessas duas proteínas são muito semelhantes. Ambas têm massa molecular de 71 Kdaltons e são quase idênticas no comprimento, com pouco mais de 600 aminoácidos dos quais 63% estão em sequência idêntica. Os aminoácidos que formam o canal de

ligação do substrato, os sítios catalíticos e os resíduos imediatamente adjacentes são idênticos, exceto por duas pequenas variações: Ile na COX-1 é trocada por Val na COX-2 nas posições 434 e 523 (VANE et al., 1998). Além disso, a serina acetilada pelo ácido acetilsalicílico é Ser 530 na COX-1 e Ser 516 na COX-2. Apesar da semelhança, COX-1 e COX-2 são proteínas distintas, codificadas por genes separados em cromossomos diferentes, COX-1 no cromossomo 9 e COX-2 no cromossomo 1 (BAKLE, 1999).

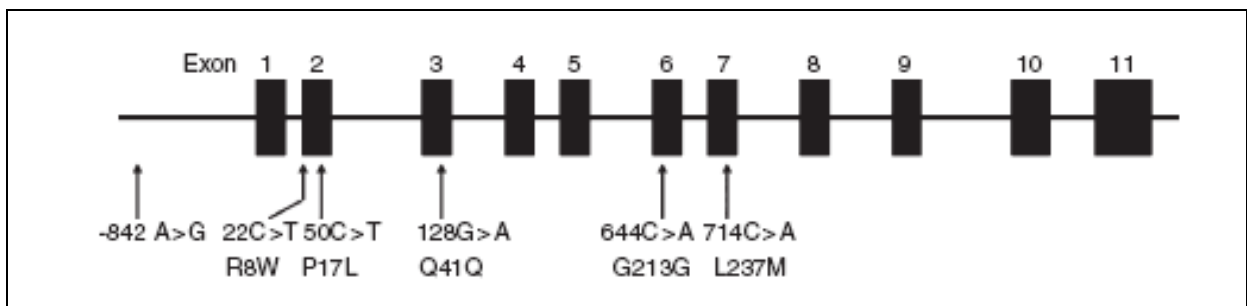
As duas formas de COX apresentam diferenças na seletividade de substrato e inibidores, bem como nas localizações celulares. COX-2 aceita como substratos uma maior variedade de ácidos graxos do que a COX-1. Assim, ambas utilizam ácido araquidônico e dihomo- $\gamma$ -linolenato, mas a COX-2 também aceita ácido eicosapentaenóico, ácido  $\gamma$ -linolênico e ácido linoléico com mais eficiência que a COX-1. A COX-2 acetilada pelo AAS é capaz de oxidar AA formando ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE), enquanto que a COX-1 acetilada da mesma forma não oxida AA de forma alguma (VANE et al., 1998).

Em 2002, Chandrasekharan et al. relataram o isolamento de RNAm variante da COX-1, encontrado em maiores concentrações no córtex cerebral e coração de cão, denominada de COX-3. O RNAm da COX-3, quando comparado com o da COX-1, difere pela retenção de um íntron formado por 90 nucleotídeos próximo à posição 5' terminal da molécula. A retenção deste íntron insere 30 aminoácidos na molécula de COX-3 canina. Foi postulado que estes aminoácidos adicionais poderiam alterar a dobradura e, conseqüentemente, as propriedades enzimáticas da COX-3. Alguns pesquisadores preferem chamar esta enzima de COX-1b ou COX-1 variante, porque o RNAm é codificado pelo gene da COX-1 (HERSH et al., 2005).

Em 2003, Halushka et al. estudaram variações genéticas da COX-1 e verificaram que dois polimorfismos, A-842G e C50T estavam em completo desequilíbrio de ligação (**Figura 2.4**). A-842G está localizado no promotor da COX-1 e o alelo G cria um sítio de fator de transcrição AP2 teórico. A variante C50T codifica uma substituição não-sinônima (Pro17Leu) próxima ao sítio de clivagem do peptídeo sinal. O haplótipo A-842G está associado a uma diminuição da síntese de prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), precursor do tromboxano A<sub>2</sub>, quando comparado ao haplótipo de alelos selvagens. HALUSHKA et al. (2003) verificaram que uma pré-



incubação de plaquetas com 30 $\mu$ mol/L de AAS por trinta minutos diminuiu a formação de prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (**Figura 2.3**) no grupo heterozigoto que apresentava o haplótipo -842G/50T, em nível significativo quando comparado ao grupo homozigoto para o haplótipo selvagem -842A/50C. Uma diminuição nos níveis de COX-1 nas plaquetas poderia explicar o mecanismo pelo qual houve um aumento na sensibilidade ao AAS por parte do grupo heterozigoto quando comparados ao grupo sem a mutação. Halushka et al. consideraram a possibilidade de que a adição de um terceiro sítio AP2, agindo como elemento repressor, poderia diminuir o nível de COX-1 nas plaquetas. Nível mais baixo de COX-1 poderia ser mais prontamente inibido pelo AAS, resultando em menor produção de PGH<sub>2</sub> (**Figura 2.3**). Desta forma, os heterozigotos para os polimorfismos A-842G e C50T têm possivelmente menor capacidade de metabolizar o ácido araquidônico pela via da COX-1 (**Figura 2.3**). Esses pesquisadores não encontraram homozigotos para o haplótipo -842G/50T e, por isto, não puderam avaliar seu efeito embora tenham sugerido que estes indivíduos poderiam ter uma resposta ao AAS ainda mais alterada.



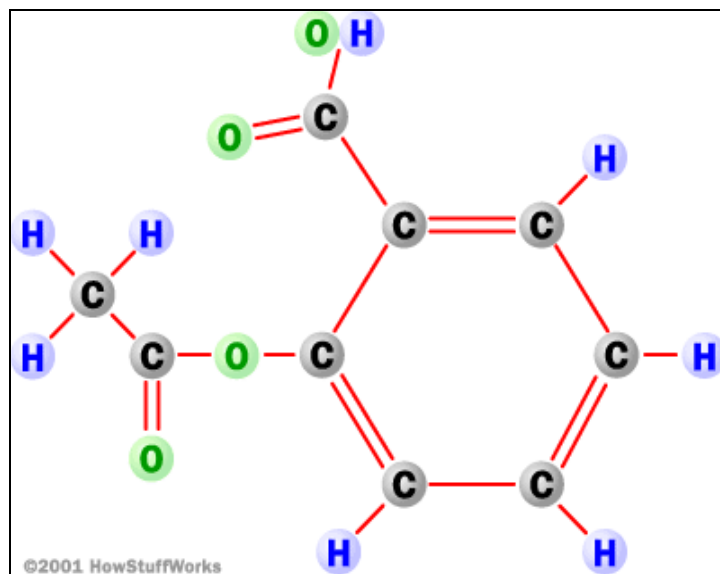
**Figura 2.4** - Representação do gene da Ciclooxygenase 1 (COX-1) com as variantes genéticas mais comuns, indicando as correspondentes alterações nos aminoácidos. A variante do promotor está em completo desequilíbrio de ligação com a variante C50T do peptídeo sinal.

## 2.8 Ácido acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS) é o produto formado pela acetilação do grupo hidroxila do anel benzeno do ácido salicílico (**Figura 2.5**). O AAS é amplamente utilizado como droga analgésica, antipirética e antiinflamatória. Embora a importância terapêutica dos salicilatos seja conhecida há séculos, o primeiro relato de um

possível efeito antitrombótico do AAS foi feito em 1953, no *Mississippi Valley Medical Journal* (CRAVEN apud VANE, 2003) e os primeiros estudos da inibição da síntese de prostaglandinas, responsável pelo efeito antiagregante do AAS, foram descritos em 1971, por Smith e Willis.

O AAS, nas doses entre 30 e 400mg, é rápida e completamente absorvido e já age na circulação porta em seis minutos. Sua ação é pré-sistêmica, o que evita interferência da função hepática na ação da droga. O AAS é deacetilado no fígado, parede intestinal e hemácias, e apenas traços dessa droga são encontrados no sangue. Sua meia vida é de treze a trinta e um minutos, o que previne a inibição da síntese de prostaciclina nas células endoteliais vasculares (PATEL et al., 1990). O uso contínuo de AAS pode causar alguns efeitos indesejáveis como dor no estômago e sangramento gastrointestinal leve (micro hemorragias) (ANVISA, 2010).



**Figura 2.5 – Representação da molécula do ácido acetilsalicílico**

O ácido salicílico (AS) é o principal metabólito plasmático do AAS, sendo que, em concentrações abaixo de 100µg/mL, cerca de 90% está ligado a proteínas, passando para 50% em concentrações acima de 400µg/mL. A principal via de sua remoção é a conjugação do AS com a glicina, formando ácido salicílico (ASU), que é o metabólito mais excretado na urina e um dos mais adequados para

monitoramento do tratamento com AAS. Outra via importante é a conjugação do AS com ácido glicurônico, formando salicilacilglicuronato (ASG). Outros metabólitos também são formados e excretados na urina em quantidades menores, como os produtos da hidroxilação do anel do AS, o ácido gentísico (ácido 2,5 hidroxibenzóico - AG) e o ácido 2,3 dihidroxibenzóico, junto com o ácido gentisúrico (AGU - o conjugado da glicina com ácido gentísico) e o glicuronato fenólico do ácido salicílico. Pequenas quantidades de AS também são excretadas, sendo que em urinas ácidas os salicilatos são reabsorvidos pelos túbulos renais (PATEL et al. 1990; KRIVOSIKOVA et al., 1996).

O AAS inibe a síntese de  $TXA_2$  por meio da inativação da COX-1 plaquetária. Este processo acontece pela acetilação irreversível da COX-1 na serina na posição 530, impedindo a ligação do ácido araquidônico ao sítio ativo da enzima. Isto acontece de forma rápida e irreversível na circulação portal, antes que o AAS seja deacetilado no fígado. A plaqueta cuja COX-1 foi inativada tem sua capacidade de agregação prejudicada, pois ela não tem capacidade para sintetizar COX-1 (EIKELBOOM et al., 2002; PATRONO et al., 2004).

A acetilação da COX-1 plaquetária só atinge relevância funcional quando a capacidade máxima de gerar  $TXA_2$  é reduzida, no mínimo, em 90 a 95% da capacidade normal (HELGASON et al., 1993; VANE et al., 1998, EIKELBOOM et al., 2008). No entanto, quantidades residuais da COX-1 podem gerar quantidades suficientes de  $TXA_2$  para manter a ativação plaquetária e nestes casos pode ser necessária a inibição de 95 a 99% da COX-1 para inibição ótima das plaquetas (EIKELBOOM et al., 2008). O uso diário de AAS tem efeito cumulativo e, depois de sete a dez dias, deveria ser observada supressão completa da síntese de  $TXA_2$  plaquetário. Seu efeito permanece por 7 a 10 dias, tempo de permanência da plaqueta na circulação sanguínea. Quando o uso diário de AAS é interrompido, a atividade da COX-1 retorna aos poucos com a entrada de novas plaquetas na circulação (CAMARGO et al., 2007).

Diversos estudos clínicos têm mostrado que um grupo significativo de pessoas não se beneficia dos efeitos do AAS na prevenção de eventos aterotrombóticos. Esta situação foi inicialmente denominada “resistência ao AAS” e hoje é considerada

“falha do tratamento com AAS” (HELGASON et al., 1993 e 1994; GUM et al., 2001 e 2003; EIKELBOOM et al., 2002, GRUNDMAN et al., 2003; GENGO et al., 2008).

### **2.8.1 Falha no tratamento com o ácido acetilsalicílico**

A falha no tratamento com AAS com a finalidade de prevenção de evento aterotrombótico pode ser definida em termos clínicos e laboratoriais. Do ponto de vista clínico, é definida como incapacidade do AAS de prevenir acidentes isquêmicos aterotrombóticos em pacientes em uso de AAS. O diagnóstico clínico da falha no tratamento com AAS é limitado porque é retrospectivo (feito após o evento) e inespecífico. Esta falha de tratamento pode ser diagnosticada no laboratório pelo estudo da função plaquetária dependente de tromboxano  $A_2$  ou pela medida da produção de tromboxano  $A_2$ .

Os testes de função plaquetária que são dependentes da produção de tromboxano plaquetário incluem a agregação plaquetária induzida por agonistas, medida por transmissão de luz ou ótica (agregometria turbidimétrica em plasma rico em plaquetas), impedância elétrica (agregometria plaquetária em sangue total) e agregometria plaquetária semi-automatizada. Estes testes, embora tenham sido considerados os melhores, apresentam diversas limitações como baixa reprodutibilidade, necessidade de grande amostra de sangue e de preparo da amostra, demora na realização do teste, necessidade de operador muito bem treinado e alto custo (MICHELSON et al., 2006).

O tempo de sangramento foi o primeiro teste de função plaquetária incluído na rotina laboratorial (início do século XX), sendo dependente da produção de tromboxano plaquetário. Esse teste possui muitas desvantagens devido à baixa sensibilidade e especificidade, pois é afetado pelo fator de von Willebrand, é altamente dependente do operador e fracamente reprodutível (MICHELSON et al., 2006).

A produção de  $TXA_2$  pode ser determinada pela análise de seus metabólitos estáveis como  $TXB_2$  no soro ou plasma e 11-dh $TXB_2$  e/ou 2,3-dinor- $TXB_2$  na urina. Como a produção de  $TXB_2$  é extremamente dependente da COX-1 (alvo terapêutico

do AAS), esse tem sido usado como medida dos efeitos inibitórios induzidos nas plaquetas pelo AAS em baixas doses. Desde 1987, a quantificação de 11-dhTXB<sub>2</sub> na urina tem sido indicada como marcador de produção de TXA<sub>2</sub>. Catella et al. (1987) e Eikelboom et al. (2002, 2008) confirmaram a escolha do 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário como indicador da produção de TXA<sub>2</sub> e consequente estado de ativação plaquetária.

Níveis elevados de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, que refletem a inibição incompleta da formação de TXA<sub>2</sub> pelo AAS, foram associados ao aumento de quase duas vezes no risco de morte por acidente cardiovascular, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral em pacientes dos estudos HOPE (*Heart Outcome Prevention Evaluation*) e CHARISMA (*Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance*) (EIKELBOOM et al., 2002, 2008).

DiMinno et al. (1986) foram os primeiros pesquisadores a mostrar que doses padrões de AAS não eram efetivas em pacientes diabéticos, e associaram esta redução na eficácia do AAS ao aumento no fluxo de entrada de plaquetas jovens na circulação sanguínea.

Um dos primeiros estudos a mostrar uma associação entre a detecção de falha no tratamento com AAS e o risco de acidentes vasculares graves foi um estudo de coorte envolvendo 181 pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) prévio que foram tratados com AAS como prevenção secundária de AVC. Após dois anos de acompanhamento, 40% dos pacientes que apresentaram falha no tratamento com AAS tiveram um AVC grave, sendo que apenas 4,4% daqueles sem falha tiveram acidentes semelhantes (GROTEMEYER et al., 1993).

Em 2003, Gum e colaboradores publicaram os resultados de um estudo de coorte incluindo 326 pacientes com doença cérebro ou cardiovascular tratados com dose diária de 325 mg de AAS, e que foram acompanhados durante dois anos. Dentre os pacientes com falha no tratamento com AAS, 29% tiveram um acidente vascular grave no período do estudo, sendo que apenas 10% dos que não apresentaram esta falha tiveram um evento da mesma magnitude (GUM et al., 2003).

Diversos estudos randomizados avaliaram o efeito do AAS na prevenção primária de eventos cardiovasculares e incluíram pacientes com DM. No **Quadro 1** estão relacionados alguns deles. O “*Physicians’ Health Study*” (PHS) (SCPHSRG, 1989), o

“*Primary Prevention Project*” (PPP) (SACCO et al., 2003) e o *Women’s Health Study* (WHS) (RIDKER et al., 2005) foram estudos populacionais e não focavam no paciente diabético sendo que o PPP não incluiu mulheres e o WHS não incluiu homens. O “*Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis With Aspirin for Diabetes*” (JPAD) (OGAWA et al., 2008) e o “*Prevention of Progression of Arterial Disease and Diabetes*” (POPADAD) (BELCH et al., 2008) inscreveram apenas pacientes diabéticos para participar. As doses de AAS variaram de 81mg a 325mg. O tempo de seguimento foi de 3,7 a 10,0 anos.

O PHS acompanhou 533 homens e encontrou redução no risco relativo (RR) de 41% (RR 0,59; 95% CI 0,33-1,06) de infarto do miocárdio (IM) fatal e não fatal durante 5 anos para aqueles que tomaram 325mg de AAS em dias alternados quando comparados aos que receberam placebo (SCPHSRG, 1989). O PPP arregimentou 1031 pacientes e encontrou uma redução não-significativa de IM fatal e não fatal durante 3,7 anos para aqueles que tomaram 100mg de AAS diariamente, quando comparados aos que receberam placebo (RR 0,50; 95% CI 0,17-1,46) (SACCO et al., 2003).

O WHS, o único com foco nas mulheres e com a menor dose de AAS (100mg em dias alternados), não encontrou redução no risco para doença cardiovascular (DCV) no grupo como um todo e nem no subgrupo das diabéticas (n=1027; RR 1,34; 95% CI 0,85-2,12). No entanto, foi encontrada redução no risco para AVC naquelas pacientes diabéticas que fizeram uso de AAS (RR 0,45; 95% CI 0,25-0,82) (RIDKER et al., 2005).

No JPAD foi investigada a eficácia de baixas doses de AAS para prevenção primária de eventos cardiovasculares em 2539 pacientes diabéticos com DM2 e sem relato de DCV. Os pacientes foram divididos em três grupos: os que receberam AAS nas doses de 81mg por dia, os que receberam 100mg diários e os que não receberam AAS. O ponto final primário foi composto de doença cardíaca isquêmica fatal ou não fatal, AVC fatal ou não fatal, e doença arterial periférica. Ocorreram 154 eventos: 68 (5,4%) no grupo do AAS e 86 (6,7%) no grupo sem AAS (HR 0,80; 95% CI 0,58-1,10). O ponto final secundário, composto de morte por evento coronariano ou cerebrovascular, ocorreu em um paciente do grupo do AAS (AVC) e em dez do grupo sem AAS (5 IM e 5 AVC fatais) (HR 0,10; 95%CI 0,01-0,79). Outros pontos

finais secundários não foram diferentes entre os grupos. Ao final, ocorreram 34 mortes no grupo que tomou AAS e 38 no grupo que não tomou AAS (HR 0,90; 95% CI 0,57-1,14). No entanto, quando considerado o subgrupo de pacientes com mais de 65 anos (n=1363), a incidência de ponto final primário foi menor para aqueles que tomavam AAS (HR 0,68; 95% CI 0,46-0,99) (OGAWA et al., 2008).

O POPADAD estudou se o tratamento com AAS e/ou antioxidantes era mais eficiente do que placebo para reduzir a incidência de eventos cardiovasculares em pacientes com diabetes e doença arterial periférica assintomática. Este estudo randomizado, multicêntrico, duplo-cego e controlado com placebo, envolveu 1276 adultos com idade superior a quarenta anos com diabetes mellitus tipo 1 ou 2, sem doença cardiovascular sintomática. Os participantes do estudo foram randomizados num desenho fatorial 2X2 com 100mg de AAS diariamente, um suplemento antioxidante diário, ambos ou nenhum. Os dois pontos finais foram: 1) morte por doença cardiovascular ou AVC, IM ou AVC não fatais, ou amputação acima do tornozelo devido à isquemia crítica de membro; e 2) morte por DCV ou AVC. A taxa de abandono foi de 14% no primeiro ano e 50% em cinco anos. Ao final, 116 de 638 (18,2%) de eventos primários ocorreram em pacientes em uso de AAS contra 117 de 638 (18,3%) daqueles tomando placebo (HR 0,95; 95% CI 0,76-1,26). Aconteceram 43 mortes por DCV ou AVC no grupo do AAS e 35 no grupo do placebo (6,7% X 5,5%; HR 1,23; 95% CI 0,79-1,93). As taxas de diversos pontos finais secundários e eventos adversos não foram diferentes entre os grupos. Os desfechos foram semelhantes com ou sem antioxidantes e não houve interação entre os dois tratamentos ativos (BELCH et al., 2008).

**Quadro 1 - Comparação de estudos de prevenção primária em pacientes em uso de AAS**

Estudo <sup>Ref</sup> / Ano	Dose de AAS	Anos de seguimento	Número de pacientes	% ocorrência DCV (controle x AAS)	DCV RR (95% CI)	AVC RR (95%CI)
PHS <sup>1</sup> / 1989	325mg em dias alternados	5	533	10,5% x 6,2% (27/258 x 17/275)	0,59 (0,33-1,06)	1,50 (0,69-3,25)
PPP <sup>2</sup> / 2003	100mg diários	3,7	1031	2,0% x 1,0% (10/512 x 5/519)	0,49 (0,17-1,43)	0,90 (0,38-2,09)
WHS <sup>3</sup> / 2005	100mg em dias alternados	10,0	1027	5,9% x 7,9% (29/44 x 42/533)	1,34 (0,85-2,12)	0,45 (0,25-0,82)
JPAD <sup>4</sup> / 2008	81-100mg diários	4,4	2539	1,1% x 1,0% (14/1277x12/1262)	0,87 (0,40-1,87)	0,65 (0,39-1,11)
POPADAD <sup>5</sup> / 2008	100mg diários	6,7	1276	12,9% x 13,9% (82/638x89/638)	1,09 (0,82-1,44)	0,74 (0,49-1,12)

AVC = Acidente Vascular Cerebral; DCV =Doença Cardiovascular; DM=Diabetes Mellitus; JPAD = *Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis with Aspirin for Diabetes*; PHS = *Physician' Health Study*; POPADAD = *Prevention of Progression of Arterial Disease and Diabetes*; PPP = *Primary Prevention Project*; RR = Risco Relativo; WHS = *Women's Health Study*

1 - *Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group*, 1989; 2 - SACCO et al., 2003; 3 - RIDKER et al., 2005; 4 - OGAWA et al., 2008; 5 - BELCH et al., 2008.

Como já foi descrito na introdução, duas metanálises recentes (BAIGENT, 2009; ZHANG et al., 2010) mostraram que o uso de AAS em pacientes diabéticos para prevenção primária não reduziu significativamente o risco de eventos cardiovasculares, evidenciando uma falha no tratamento.

### **2.8.2 Prevalência da falha no tratamento com o ácido acetilsalicílico**

As estimativas da prevalência de falha no tratamento com AAS encontradas na literatura para a população em geral, variam de 5,5 a 61%. Esta grande variação pode ser devido a inúmeros motivos. Nos diversos estudos publicados, as amostras



apresentavam tamanhos variados, os testes laboratoriais usados para determinar a falha ao tratamento eram diferentes e muitas vezes o número de pacientes era pequeno. Alguns estudos não consideraram variáveis como o sexo do paciente, a idade, presença de dislipidemia, diabetes e/ou hipertensão bem como a comprovação da adesão ao tratamento por parte do paciente. Para pacientes diabéticos, estudos recentes apresentam valores de prevalência de falha no tratamento com AAS entre 10 e 40% (AJJAN et al., 2008). Em 2005, Fateh-Moghadan et al. publicaram o resultado de um estudo de prevalência de falha no tratamento com AAS em pacientes diabéticos, relatando ter encontrado prevalência de 21,5%. No entanto, este estudo foi baseado em testes de função plaquetária, que avaliam aspectos da reatividade plaquetária independentes da liberação de tromboxano A<sub>2</sub>. Por isto, estes testes não quantificam especificamente a inibição do COX-1 pelo AAS.

### **2.8.3 Mecanismos de falha no tratamento com o ácido acetilsalicílico**

De acordo com documento publicado pelo “*Working Group on Aspirin Resistance*” (MICHELSON et al., 2005), os possíveis mecanismos de falha no tratamento com AAS podem estar relacionados à biodisponibilidade da droga, interações das plaquetas com outras células, polimorfismos de genes que codificam proteínas envolvidas no mecanismo de ação da droga ou da ativação plaquetária, função plaquetária alterada e a outros fatores como tabagismo e hipercolesterolemia.

Com relação à biodisponibilidade do AAS, é preciso considerar se a dose não seria subterapêutica, se não haveria baixa absorção da droga (como nos casos dos comprimidos revestidos) (COX et al., 2006, MAREE et al., 2005,a), interferência devido ao uso de outra droga anti-inflamatória não esteroide e, finalmente, se o paciente realmente aderiu ao tratamento. A não adesão ao tratamento tem sido a preocupação de farmacêuticos envolvidos no acompanhamento de diversas formas de tratamento de pacientes. Alguns pesquisadores já verificaram que, no caso específico do uso diário constante e domiciliar de AAS para prevenção de evento aterotrombótico, a não adesão ao tratamento é uma importante causa da suposta

falha no tratamento com AAS (SCHWARTZ et al., 2005, 2008; CUISSET et al., 2009).

Outra causa de falha no tratamento com AAS pode ser a produção de tromboxano A<sub>2</sub> pela tromboxano sintase de monócitos circulantes e de macrófagos presentes na placa aterosclerótica. Além disso, tromboxano A<sub>2</sub> também pode ser formado nas plaquetas por vias não catalisadas pela COX-1, e sim pela COX-2, que também pode estar presente nas plaquetas e megacariócitos e é regulada pelos mediadores pró-inflamatórios da doença cardiovascular. A expressão da COX-2 pode estar aumentada em momentos de grande reposição de plaquetas, quando surgem muitas plaquetas imaturas (cirurgia recente, estados infecciosos e inflamatórios e, talvez, até aterosclerose ativa) (HANKEY et al., 2006).

Estudos epidemiológicos sugerem que um terço das variações na resposta laboratorial às drogas antiplaquetárias é determinado geneticamente. A falha no tratamento com AAS já foi associada aos polimorfismos do gene da COX-1 (MAREE et al., 2005,b) e a variações genéticas da GPIIIa (MACCHI et al., 2003). Variações genéticas da GPIIIa foram associadas à trombose coronariana como um fator de risco independente (KUNICKI et al., 1992). Gum et al. (2001) mostraram que o polimorfismo da GPIIIa em homozigose está associado a um risco três vezes maior de doença cardiovascular isquêmica e quatro vezes maior de infarto do miocárdio. Gonzalez-Cornejero et al. (2005) encontraram associação entre o polimorfismo C50T da COX-1 e níveis elevados de 11-dhTXB<sub>2</sub> antes e após o uso de AAS em indivíduos saudáveis.

O tabagismo atenua significativamente a inibição da agregação plaquetária induzida pelo AAS (HUNG et al., 1995). No “*Physician’s Health Study*” (SCPHS, 1989) e no “*Thrombosis Prevention Trial*” (MICHELSON et al., 2005) foram encontradas evidências de que o colesterol total elevado está associado a respostas clínicas insatisfatórias ao uso de AAS como prevenção de evento aterotrombótico.

As plaquetas dos pacientes diabéticos respondem mais prontamente a pequenos estímulos e são eliminadas da circulação precocemente, promovendo trombopoiese acelerada que libera novas plaquetas na circulação. Estas plaquetas são fonte de fator plaquetário 4, interleucina-1 $\beta$  e CD40L e também tem aumento da expressão de GPIb e GPIIb/IIIa na sua superfície (NATARAJAN et al., 2008). A hiperglicemia

aumenta a glicação de proteínas, afetando o principal mecanismo de ação do AAS pela competição entre a acetilação e a glicação (WATALA et al., 2005). Esta competição pode alterar os efeitos da inibição da COX-1 e interferir nas funções de outras enzimas e proteínas receptoras (ZYTKIEWICZ et al., 2008). Dichiara et al. (2007) relataram persistência da função plaquetária em pacientes diabéticos em uso de AAS na dose de 81 mg/dia. Sacco et al. (2008) relataram menor eficiência da terapia com doses baixas de AAS para prevenção primária de doença cardiovascular em pacientes diabéticos. No entanto, a função plaquetária raramente é medida na prática clínica rotineira e assim os clínicos não sabem quais dos seus pacientes estão respondendo ao tratamento com AAS.

Considerando a importância e atualidade do tema, torna-se pertinente o estudo do efeito do uso regular de AAS sobre as plaquetas de pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus 2 em risco de doença aterotrombótica, com a finalidade de identificar aqueles com resposta insatisfatória bem como as possíveis causas desta falha. A análise dos efeitos do AAS sobre a enzima COX-1 e de seus reflexos na produção de tromboxanos permite a avaliação minuciosa do benefício do uso de AAS na prevenção primária ou secundária de eventos aterotrombóticos, fornecendo subsídios para que esta abordagem seja aperfeiçoada.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido acetilsalicílico na produção de tromboxano  $A_2$  em indivíduos diabéticos tipo 2, por meio da dosagem de 11-dihidro tromboxano  $B_2$  urinário, e investigar se esse efeito está associado a variáveis clínicas e laboratoriais.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar a associação entre o uso de ácido acetilsalicílico e o marcador de produção de Tromboxano  $A_2$  (11-dihidro tromboxano urinário);
- Investigar a associação entre os níveis 11-dihidro tromboxano urinário e dados clínicos dos pacientes, tais como idade, sexo e índice de massa corporal;
- Investigar a associação entre os níveis de 11-dihidro tromboxano urinário e proteína C reativa ultra-sensível (marcador de estado inflamatório), hemoglobina glicada (marcador de controle glicêmico), dímero-D (marcador de fibrinólise) e valores de colesterol total e suas frações;
- Investigar a associação entre os níveis de 11-dihidro tromboxano urinário e os polimorfismos da glicoproteína GPIIIa e da ciclooxygenase 1;
- Investigar a associação entre os níveis de 11-dihidro tromboxano urinário e os grupos sanguíneos do sistema ABO.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte (Anexo 2). Todos os participantes foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, responderam a um questionário destinado a fornecer informações para o preenchimento da ficha clínica (Apêndice A) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com a Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde (Apêndice B).

### 4.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo observacional, analítico e transversal de uma amostra intencional de participantes com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, de ambos os sexos e idade variada. Cada participante foi avaliado em dois momentos: o primeiro com o mínimo de quinze dias sem ingestão de AAS e o segundo com quinze dias de uso diário de AAS na dosagem de 100mg após o almoço. Foram comparados os resultados dos dois momentos.

### 4.2 Critérios de inclusão

- Diagnóstico clínico de diabetes mellitus, segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes vigentes em 2008 (momento do início deste trabalho), que preconizava: glicemia após jejum de oito horas igual ou superior a 126mg/dL, glicemia casual (feita a qualquer hora) igual ou superior a 200mg/dL na presença de sintomas clínicos e/ou curva de tolerância à glicose

após sobrecarga com 75g de glicose com valor superior a 200mg/dL no ponto referente a 120 minutos (ADA, 2006).

- Não estar em uso de AAS nos quinze dias que antecederam o momento da primeira coleta de sangue.
- Indicação de uso diário e constante de 100mg de AAS para prevenção primária de eventos aterotrombóticos, com início após o almoço do dia da primeira coleta.

#### **4.3 Critérios de exclusão**

- Uso de antiagregante plaquetário, anticoagulação oral, heparina fracionada ou não, antiinflamatórios não esteroidais, corticóides, antibióticos e antiácidos (inibidores da bomba de prótons).
- Ocorrência prévia de evento aterotrombótico.
- Evidência ou suspeita de doença renal crônica (relato de acompanhamento por nefrologista, hemodiálise, valores elevados de creatinina sérica, depuração de creatinina alterada), insuficiência hepática (relato de acompanhamento por hepatologista, função hepática alterada do ponto de vista laboratorial), doença infecciosa aguda, inflamatória, autoimune, mieloproliferativa ou neoplasias.
- Ter sido submetido a cirurgia nos últimos seis meses.
- Gravidez, puerpério e lactação.

#### **4.4 Casuística**

Os participantes do estudo foram selecionados entre os pacientes atendidos no Ambulatório de Diabetes Mellitus 2 do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte com diagnóstico prévio de diabetes mellitus 2. Devido à falta de dados confiáveis de prevalência de falha no tratamento com 100mg de AAS

estabelecida com base nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, o tamanho da amostra a ser estudada não foi estabelecido. Foi feita a opção por uma amostra de conveniência, com inclusão de todos pacientes que atendessem aos critérios de inclusão e exclusão e que quisessem participar do estudo, identificados durante o período de tempo estabelecido para a seleção dos participantes que foi de junho de 2008 a março de 2010.

Os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão e que, após esclarecimento sobre a pesquisa, concordaram em participar do estudo, responderam a um questionário destinado a fornecer informações para o preenchimento da ficha clínica. Eles receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para levarem para casa, lerem atentamente e trazerem assinado no dia da primeira coleta de sangue. Informações adicionais foram obtidas no prontuário do paciente.

Após consulta médica no ambulatório e concordância do médico assistente, o paciente que ainda não fazia uso de AAS, mas tinha indicação clínica para fazê-lo, foi orientado a buscar, no posto de saúde perto de sua casa, o AAS na dosagem de 100mg com a receita fornecida pelo médico assistente. A primeira coleta de sangue foi agendada para a semana seguinte e o paciente orientado a só iniciar o uso de AAS após o almoço do dia desta primeira coleta, devendo a partir de então, fazer uso do medicamento diariamente após o almoço. O paciente foi esclarecido quanto ao jejum necessário para a primeira coleta (doze horas), uso de medicamentos nesta manhã e sobre a coleta da primeira urina do dia. Todas as informações foram fornecidas por escrito e foi feito contato telefônico com o paciente no intervalo entre a seleção e a primeira coleta de sangue para reforçar as recomendações.

Aqueles pacientes que já faziam uso de AAS na dosagem de 100mg diários foram avaliados pelo médico assistente quanto à possibilidade de suspender o medicamento por quinze dias. Aqueles pacientes autorizados a fazê-lo foram orientados quanto ao procedimento de “*wash out*” (fase de limpeza), tiveram sua primeira coleta de sangue agendada para quinze dias depois e foram acompanhados neste intervalo de tempo por contato telefônico. A partir da primeira coleta de sangue, o procedimento foi o mesmo para todos os pacientes.

No dia da primeira coleta de sangue, após confirmação de que o paciente já estava de posse do medicamento, todos foram orientados a iniciar o uso de AAS na dosagem de 100mg após o almoço daquele dia e manter a medicação por, no mínimo, os próximos quinze dias, quando seria feita a próxima coleta. O jejum exigido para a segunda coleta foi de oito horas e novamente os pacientes foram orientados verbalmente e por escrito quanto aos cuidados para a segunda coleta de sangue. Foi feito pelo menos um contato telefônico com o paciente no intervalo entre as duas coletas para reforçar a necessidade do uso do medicamento e lembrá-lo do dia da segunda coleta.

#### **4.5 Variáveis descritivas**

Dados referentes a sexo, idade, peso, altura, hábito de tabagismo, uso de insulina e outros hipoglicemiantes, além de estatina e outros medicamentos, bem como diagnóstico de hipertensão e diabetes mellitus e tempo de doença foram obtidos por meio de entrevista para preenchimento de ficha clínica e de consulta em prontuário.

A idade e o tempo de doença foram definidos em anos. O paciente foi classificado quanto ao hábito de tabagismo (sem considerar tempo e consumo diário) como fumante, ex-fumante e não fumante de qualquer cigarro, charuto ou similar. Considerou-se fumante o indivíduo que tinha o hábito no momento da inclusão no estudo ou que houvesse abandonado o hábito até um ano antes. Classificou-se como ex-fumante quem houvesse abandonado o hábito há mais de um ano. Na categoria de não-fumantes foram incluídos aqueles que nunca fumaram (ALMENOFF et al., 1995).

Considerou-se hipertenso o indivíduo que estivesse em uso de medicação anti-hipertensiva na época da entrevista. A ausência de intercorrências clínicas no período de quinze dias entre as duas coletas foi acompanhada por contato telefônico.



#### 4.6 Variáveis analíticas

Foram realizados estudos de:

- Marcador da produção de tromboxano A<sub>2</sub>:
  - 11-dihidro TXB<sub>2</sub> urinário
- Marcador de estado inflamatório:
  - Proteína C Reativa ultra-sensível
- Marcador de adesão ao tratamento:
  - Metabólitos do AAS
- Marcador de controle glicêmico
  - Hemoglobina glicada
- Marcador de fibrinólise:
  - Dímero-D
- Contagem de plaquetas
- Classificação de grupo sanguíneo
- Dislipidemia:
  - Colesterol total
  - Colesterol HDL
  - Colesterol LDL
  - Triglicérides
- Polimorfismo do gene da glicoproteína plaquetária IIIa
- Polimorfismo do gene da COX-1

#### 4.7 Amostras biológicas

Foram colhidas amostras de sangue dos pacientes em dois momentos distintos. No primeiro, imediatamente antes do início do uso de AAS, foram colhidos 20mL de sangue venoso após jejum de doze horas, sendo 4,9mL em tubo com citrato de sódio; 2,7mL em tubo com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA); 2,6mL em tubo

com heparina e 9,8mL em tubo sem anticoagulante. Todos os tubos de coleta foram do fornecedor SARSTED<sup>®</sup>. O segundo momento de coleta aconteceu na manhã do décimo quinto dia de inclusão no estudo, com o paciente em uso diário de 100mg de AAS. Neste momento foram colhidos 12,4mL de sangue venoso com jejum de oito horas, sendo 4,9mL em tubos contendo citrato de sódio; 2,6mL em tubo heparinizado, e 4,9mL em tubo sem anticoagulante. Em ambas as ocasiões foram colhidas amostras da primeira urina do dia do paciente.

As amostras de sangue colhidas sem anticoagulantes foram centrifugadas a 1100g por 15 minutos, o soro separado do coágulo, aliqotado e estocado a -80°C para análise posterior. As amostras colhidas em heparina e em citrato de sódio foram centrifugadas a 1100g por 15 minutos para obtenção de amostras de plasma, que foram aliqotadas e estocadas a -80°C até o momento da análise.

A partir da amostra colhida em EDTA foi separada uma alíquota de 300µL para extração de DNA e o restante foi analisado no mesmo dia com o objetivo de obter o valor da contagem de plaquetas e dosar hemoglobina glicada. O DNA foi extraído seguindo o protocolo descrito no Apêndice C e armazenado entre 2 e 8°C até o momento da análise.

As amostras de urina foram centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram aliqotados e estocados a -80°C até o momento das dosagens.

## **4.8 Métodos**

### **4.8.1 Marcador da produção de Tromboxano A<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub> urinário)**

As determinações de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), usando o kit 11-dehydroThromboxane B<sub>2</sub> EIA Cayman Chemical Company<sup>®</sup>, Ann Arbor, MI, USA, seguindo as instruções do fabricante. O coeficiente de variação intra-ensaio deste teste é de 10,0% e o inter-ensaio, 12,2%.

Este ensaio baseia-se na competição entre 11-dhTXB<sub>2</sub> e o conjugado 11-dhTXB<sub>2</sub>-acetilcolinesterase (AChE) por um número limitado de sítios de ligação de anti-soro de coelho específicos para 11-dhTXB<sub>2</sub>. Como a concentração do conjugado é constante e a concentração de 11-dhTXB<sub>2</sub> da amostra é variada, a quantidade de conjugado que é capaz de se ligar ao anti-soro de coelho será inversamente proporcional à concentração de 11-dhTXB<sub>2</sub> presente no poço da placa onde acontece a reação de incubação. Este complexo de anti-soro de coelho - 11-dhTXB<sub>2</sub> (seja livre ou ligado a AChE) liga-se ao IgG anticoelho monoclonal de camundongo que reveste os poços da placa. A placa é lavada para remover reagentes não ligados e o Reagente de Ellman's (contém o substrato para AChE) é adicionado ao poço. O produto desta reação enzimática tem cor amarela e absorve intensamente em 412nm. A intensidade desta cor, determinada espectrofotometricamente, é proporcional à quantidade de conjugado 11-dhTXB<sub>2</sub>-AChE ligado ao poço que, por sua vez, é inversamente proporcional à quantidade de 11-dhTXB<sub>2</sub> livre presente no poço durante a incubação. Os valores obtidos espectrofotometricamente para cada amostra foram transformados em pg/mL, usando curva padrão construída com calibrador fornecido pelo kit e seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. A creatinina urinária foi determinada para padronização dos resultados (pg 11-dhTXB<sub>2</sub>/mg creatinina) por método cinético-colorimétrico, de acordo com as instruções do fabricante do kit GOLD ANALISA<sup>®</sup>. Como a dosagem de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário ainda é realizada de forma experimental, não estão estabelecidos os valores de referência.

Como a acetilação da COX-1 somente atinge relevância funcional quando a capacidade máxima de gerar TXA<sub>2</sub> é reduzida, no mínimo, em 90% da capacidade normal (HELGASON et al.,1993; VANE et al.,1998), foi investigada a redução >90% nos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub>, para avaliação do efeito do AAS. Em seguida, foi avaliada a redução ≥ 50% para verificar qual nível de redução seria mais adequado para as análises estatísticas.

#### **4.8.2 Marcador de estado inflamatório (PCRus)**

A determinação de Proteína C Reativa ultra-sensível (PCRus) foi realizada em soro, pelo método de nefelometria no aparelho BN2 - SIEMENS®. Valor de referência para avaliação de processos inflamatórios / infecciosos: > 5,00mg/L. Valor de referência para avaliação de risco cardiovascular: risco baixo: < 1,00mg/L; risco moderado: 1,00 a 3,00mg/L; risco alto: > 3,00mg/L.

#### **4.8.3 Marcador de adesão ao tratamento (metabólitos do AAS)**

A adesão ao tratamento foi monitorada pela análise de ácido salicílico e ácido salicílico (metabólitos do AAS) em plasma heparinizado, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a um detector ultravioleta.

O sistema HPLC utilizado (Acquity, Waters) é composto por bomba binária (UPB, Waters), forno de colunas para HPLC (UPX, Waters), autoinjeter (UPA, Waters) e detector PDA (UPD, Waters). A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna C18 ACE (100 x 4,6 mm, 5 µm) e a fase móvel foi constituída de 78% de acetato de amônio 2 mM em ácido fórmico 0,025% e 22% de acetonitrila. Para a preparação das amostras de plasma foram utilizados Concentrador de Amostras (Tec Vap, TE 194, TECNAL) e Centrífuga (MR23i, JOUAN).

O ácido salicílico (AHH) e o ácido hipúrico (AH) foram obtidos de ACROS Organics e o ácido salicílico (AS) de Sigma-Aldrich. Acetonitrila, acetato de amônio, ácido fórmico e ácido fosfórico foram obtidos de J.T.Baker e utilizou-se água ultra-pura obtida por sistema de purificação Milli-Q™.

O método de extração escolhido foi o de precipitação de proteínas, por ser um método rápido, de baixo custo e devido à natureza hidrofílica dos compostos a serem analisados, que dificulta a extração com a utilização de solventes orgânicos. Após a extração, 50µL das amostras foram injetadas. O tempo de corrida foi fixado em 4,5 minutos e os cromatogramas foram obtidos em detecção de 238nm. Os

tempos de retenção foram de 1,9; 2,7 e 3,4 minutos para AH, AHH e AS respectivamente.

Foram analisadas 162 amostras de plasma heparinizado correspondentes às 81 amostras colhidas antes do uso de AAS e 81 colhidas aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS.

#### **4.8.4 Marcador de controle glicêmico (HbA<sub>1c</sub>)**

A determinação de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) foi realizada em sangue total colhido em EDTA, pelo método de cromatografia líquida de troca iônica no aparelho Analisador Bioquímico TP Analyser<sup>®</sup>, método certificado pelo National Glycohemoglobin Standardization Program. Valor de referência: 3,4 a 6,4%. Alvo terapêutico para o paciente diabético: < 7%.

#### **4.8.5 Marcador de fibrinólise (dímero-D)**

A determinação quantitativa de dímero-D em amostras de plasma citratado foi realizada com o conjunto diagnóstico IMUNOCLONE<sup>®</sup> D-DIMER ELISA (American Diagnostica Inc. - Stanford, CT), seguindo as instruções do fabricante contidas na bula do kit.

Este método utiliza um anticorpo monoclonal contra dímero-D humano acoplado à superfície dos poços da placa de teste. Durante o período de incubação, o dímero-D da amostra em análise liga-se à superfície do poço coberta com anticorpos. Depois de uma etapa em que proteínas estranhas à reação são retiradas por lavagem, é adicionado um anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase (HRP), que reconhece o dímero-D ligado e completa a formação do complexo sanduíche anticorpo. Após outra etapa de lavagem, é adicionado um substrato aos poços da placa e reação com HRP forma uma solução de cor azul. A reação enzima-substrato é interrompida pela adição de ácido sulfúrico, que muda a cor da solução

para amarelo. O nível de dímero-D é quantificado pela medida da absorbância da solução em 450nm e comparação dos valores com os da curva padrão. Esta curva foi construída a partir de diluições do plasma calibrador com concentração conhecida, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. Valor de referência: < 400ng/mL.

#### **4.8.6 Contagem de plaquetas**

A contagem das plaquetas foi realizada em sangue total colhido em EDTA, no mesmo dia da coleta, de forma automatizada, em aparelho Coulter T-890<sup>®</sup>. Valor de referência: 150.000 a 400.000/mm<sup>3</sup>.

#### **4.8.7 Classificação de grupo sanguíneo**

A classificação dos grupos sanguíneos ABO foi realizada em soro pela técnica reversa em tubo, utilizando os soros comerciais anti-A, anti-B e anti-A,B (O) da marca Biotest.

#### **4.8.8 Determinação do colesterol total e fracionado**

##### **4.8.8.1 Colesterol total**

A determinação do colesterol total foi realizada em soro com o conjunto diagnóstico ANALISA<sup>®</sup>, cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico, seguindo as instruções do fabricante. Valor de referência: desejável < 200mg/dL.

#### **4.8.8.2 Colesterol HDL**

A determinação do colesterol HDL foi feita em soro com o conjunto diagnóstico ANALISA<sup>®</sup>, cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico de eliminação, seguindo as instruções do fabricante. Valor de referência: homens > 40mg/dL; mulheres > 50mg/dL.

#### **4.8.8.3 Colesterol LDL**

A determinação do colesterol LDL foi realizada em soro com o conjunto diagnóstico RANDOX<sup>®</sup> LDL CHOLESTEROL DIRECT, cujo princípio analítico é o método enzimático de eliminação, seguindo as instruções do fabricante. O colesterol LDL foi dosado na amostra em que o valor de triglicérides foi igual ou superior a 400 mg/dL. Quando o valor dos triglicérides foi inferior a 400mg/dL, o valor do colesterol LDL foi calculado pela equação de Friedwald:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{Colesterol HDL} + \text{Triglicérides}/5)$$

Valor de referência: desejável: < 150mg/dL

#### **4.8.8.4 Triglicérides**

A determinação dos triglicérides foi realizada em soro com o conjunto diagnóstico ANALISA<sup>®</sup>, cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico, seguindo as instruções do fabricante. Valor de referência: desejável: < 150mg/dL.

#### **4.8.9 Estudo do polimorfismo do gene da GPIIIa (PI<sup>A</sup>)**

A análise do polimorfismo do gene da glicoproteína IIIa foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando os oligonucleotídeos e o método descrito por UNDAS et al. em 2001 e PAMUKCU e al. em 2005, conforme descrição a seguir:

Extraído o DNA de sangue total colhido em EDTA, conforme técnica descrita no Apêndice C, amplificou-se uma região de 282 pares de base (pb) do gene que codifica a GPIIIa (íntron 2 e exon 2) utilizando os oligonucleotídeos 5' GCT CCA ATG TAC GGG GTA AAC 3' e 5' GGG GAC TGA CTT GAG TGA CCT 3'. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, finalizando com 8 minutos a 72°C.

O produto da PCR com 282 pb foi então submetido à digestão com enzima de restrição *MspI* (Promega<sup>®</sup>). O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, seguida de coloração pelo nitrato de prata. A referência foi o padrão de peso molecular "1Kb Plus" (Gibco<sup>®</sup>) (Apêndice E).

Estando presente o polimorfismo, a enzima *MspI* cliva o produto de PCR em dois fragmentos, um de 125 pb e outro de 157 pb. Os indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentam três fragmentos (282, 157 e 125 pb), os homozigotos, apenas dois (157 e 125 pb) e os indivíduos sem o polimorfismo (alelo selvagem) apresentam um fragmento de 282 pb.

#### **4.8.10 Estudo do polimorfismo do gene da COX-1**

A análise do polimorfismo C50T (RS 3842787), que está em completo desequilíbrio de ligação com o polimorfismo A842G no gene da COX-1, foi realizado através do método *nested* PCR associado ao RFLP, utilizando os oligonucleotídeos e o método utilizado por VAN OIJEN et al. (2006), conforme descrição a seguir:



Extraído o DNA total de sangue colhido em EDTA, conforme técnica descrita no Apêndice C, amplificou-se uma região de 484 pb do gene que codifica a COX-1 e em seguida foi realizada uma reamplificação de um fragmento de 178 pb. Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos:

Oligo externo R: 5' – ACAGGTGAGGGGGATGGATAG – 3'

Oligo externo F: 5' – CAGCAGCCGCGCCATGAG – 3'

Oligo interno F: 5' – CGAGCAGGACGGGGAGCTGC – 3'

Foram realizadas duas PCRs: a primeira com o oligo externo R e o oligo externo F e a segunda com o oligo externo F e o oligo interno F. Estas reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, 37 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, finalizados com 5 minutos a 72°C.

O produto de 178 pb foi então submetido à digestão com enzima de restrição *Acil* (Promega®). Os fragmentos foram visualizados através de eletroforese em gel de poli-acrilamida 8% revelada com nitrato de prata (Apêndice F). Os indivíduos sem o polimorfismo apresentaram fragmentos de 158 pb + 20 pb, os heterozigotos, fragmentos de 178 pb + 158 pb + 20 pb e os homozigotos apresentaram fragmento de 178 pb.

#### **4.9 Análise estatística**

Todos os dados foram analisados quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro Wilks. Os resultados são apresentados como média e desvio-padrão (DP) quando apresentam distribuição normal e, como mediana e intervalo interquartil, quando a sua distribuição não é normal.

Foram utilizados inicialmente os seguintes testes para comparação entre grupos: Qui-quadrado de Pearson, Exato de Fisher, Mann Whitney, Kruskal Wallis, teste t, Wilcoxon, McNemar e teste da diferença. Para avaliar a associação entre as características basais dos pacientes e os níveis de redução do 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário,

foi realizado um modelo de regressão logística múltipla (utilizando redução de  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinários como variável resposta). Foram incluídas nesta análise todas as variáveis que apresentaram significância  $\leq 0,20$  na análise univariada. A adequação do modelo de regressão foi avaliada pelo teste Hosmer e Lemeshow. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises realizadas neste estudo. Todas as análises foram realizadas com o programa “*Statistical Package of the Social Sciences*” (SPSS) versão 13.0

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfil dos participantes do estudo

No período compreendido entre junho de 2008 e março de 2010 foram identificados cento e dois pacientes que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, disseram querer participar do estudo e foram autorizados pelo médico assistente. Deste total, treze não compareceram à primeira coleta agendada e, ao serem contatados por telefone, não quiseram agendar outra data para coleta. Dos oitenta e nove pacientes que se submeteram à primeira coleta de sangue e urina, oito não retornaram para a segunda coleta agendada e, embora contatados por telefone, não se prontificaram a agendar nova data para a segunda coleta de material. Participaram do estudo 81 pacientes, que estão caracterizados na **Tabela 5.1**.

**Tabela 5.1 - Caracterização dos participantes do estudo (n=81)**

<b>Covariável</b>	<b>Resultado</b>
Mulheres (n %)	58 (71,6)
Homens (n %)	23 (28,4)
Idade média ( $\pm$ DP anos)	57,20 ( $\pm$ 9,85)
Hipertensão (n %)	68 (85,2)
Tempo de diagnóstico de DM2 no momento de inclusão no estudo (mediana anos)	4
Intervalo Interquartilico (anos)	3-6
Tabagista (n %)	9 (11,1)
Ex-tabagista (n %)	18 (22,2)
Não-tabagista (n %)	54 (66,7)
Índice de massa corporal (mediana kg/m <sup>2</sup> )	30,00
Intervalo Interquartilico (kg/m <sup>2</sup> )	25-32

O perfil do uso de medicamentos hipoglicemiantes, de estatina e de inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) está apresentado na **Tabela 5.2**. Quanto a este perfil, foi observado que o medicamento mais utilizado foi o hipoglicemiante oral, sendo que 66 pacientes (81,50%) faziam uso deste medicamento. Por outro lado, o medicamento menos utilizado foi a insulina de forma isolada, com apenas 10% dos pacientes nesta situação. Cumpre ressaltar que seis pacientes (7%) não faziam uso de qualquer medicação para controle de diabetes, hipertensão e dislipidemia.

**Tabela 5.2 – Perfil de uso de medicamentos pelos participantes do estudo (n=81)**

<b>Medicação</b>	<b>Participantes (n %)</b>
Sem medicação para DM2	6 (7,0)
Uso de apenas hipoglicemiante oral	25 (31,0)
Uso de hipoglicemiante oral	66 (81,5)
Uso apenas de insulina	8 (10,0)
Uso de insulina	50 (61,7)
Uso de insulina e hipoglicemiante oral	42 (52,0)
Uso de estatina	45 (55,6)
Uso de IECA	48 (59,0)

---

DM2: Diabetes mellitus tipo 2; IECA: Inibidor da enzima conversora de angiotensina.

## 5.2 Marcador da produção de Tromboxano A<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub> urinário)

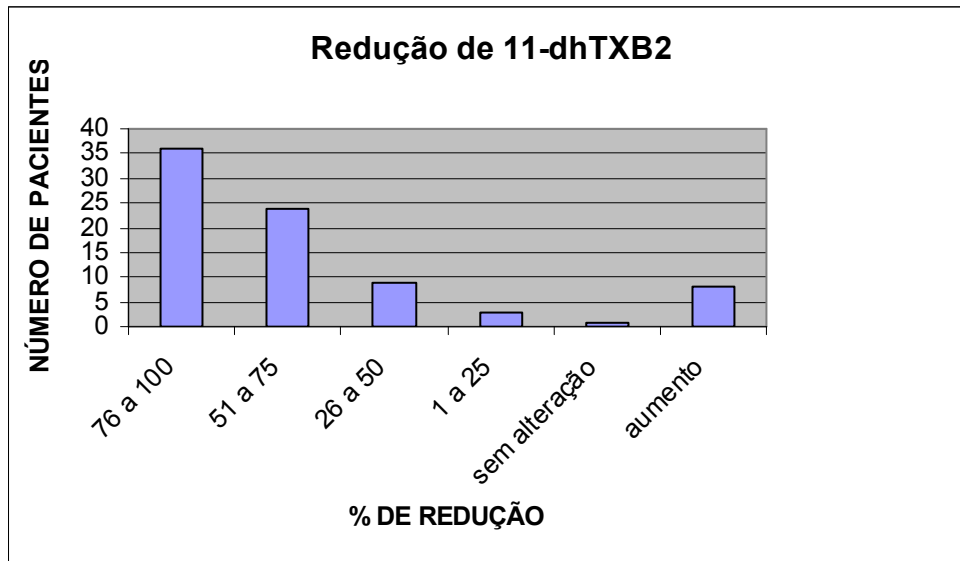
Os valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> não apresentaram uma distribuição normal e, portanto, seus resultados são apresentados em mediana e intervalo interquartílico. A **Tabela 5.3** mostra as medianas dos valores observados antes do uso de AAS e aos quinze dias de uso diário de 100mg de AAS, apresentando diferença significativa entre os valores ( $p=0,00$ ).

**Tabela 5.3** - Valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81)

<b>11-dhTXB<sub>2</sub> urinário</b>	<b>Mediana</b> (pg/mg creatinina)	<b>Intervalo Interquartílico</b>
Antes do uso de AAS	179,00	117,00-289,00
Aos 15 dias de uso diário de 100mg AAS	51,00	32,50-78,50
Valor de p*	0,00	

\* teste Wilcoxon

A redução desejável de 95% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário foi encontrada em apenas 4 pacientes (5%) enquanto que 11 (14%) pacientes apresentaram redução de 90% destes níveis. Reduções entre 76 e 100% foram encontradas em 36 pacientes (44%), de 51 a 75% em 24 pacientes (30%) e de 26 a 50% em 9 pacientes (11%). Três pacientes (4%) tiveram redução entre 1 e 25% e um paciente não apresentou alteração nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário. Oito pacientes apresentaram elevação nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, sendo que destes oito, apenas três apresentaram também elevação dos níveis de PCRus. Na **Figura 5.1** estão representadas estas reduções.



**Figura 5.1 – Porcentagem (%) de redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81)**

Na **Tabela 5.4** estão relacionados os valores das medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário obtidos para as amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de AAS e das diferenças entre estas medianas, analisados em relação às diversas variáveis estudadas. Os valores de p foram calculados para antes e depois do uso de AAS e para os subgrupos formados dentro das variáveis. Para todos os subgrupos das variáveis foi encontrada diferença significativa entre os valores obtidos nas amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de AAS. Nesta tabela também estão relacionadas as porcentagens de redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário para cada subgrupo das variáveis.

Considerando as variáveis: sexo do paciente, presença ou não de hipertensão, hábito de tabagismo, índice de massa corporal, perfil lipídico, hemoglobina glicada e polimorfismo na COX-1, entre os subgrupos foi encontrada diferença significativa entre as medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de AAS. No entanto, esta diferença não foi observada quando comparados os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário num mesmo momento entre os subgrupos das variáveis (colunas 2 e 3 da **Tabela 5.4**). Analisando os valores encontrados para os subgrupos da variável polimorfismo na GPIIa, foi encontrada diferença significativa entre as medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas aos 15 dias de uso de AAS dos pacientes com e sem polimorfismo embora

seus valores basais não sejam significativamente diferentes. Avaliando as diferenças entre os valores das medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso de AAS dos pacientes, distribuídos pelos subgrupos das variáveis estudadas (coluna 6 da **Tabela 5.4**), foi encontrada diferença significativa apenas para as variáveis sexo (p=0,026) e IMC (p=0,028).

**Tabela 5.4 - Valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS de acordo com as características dos participantes**

<b>Características dos participantes</b>	<b>11-dhTXB<sub>2</sub> antes do uso de AAS</b> Mediana (pg/mg creatinina) Intervalo Interquartilico	<b>11-dhTXB<sub>2</sub> aos 15 dias de uso de AAS</b> Mediana (pg/mg creatinina) Intervalo Interquartilico	<b>Valor de p*</b>	<b>% redução</b>	<b>Diferença=11-dhTXB<sub>2</sub> depois-11-dhTXB<sub>2</sub> antes</b>	<b>Valor de p</b>
Homens (n=23)	151,00 (104,00-205,00)	52,00 (33,00-70,00)	0,00	66	-81,00(-38,00;-159,00)	<b>0,026**</b>
Mulheres (n=58)	204,00 (130,75-319,75)	51,00 (32,00-80,25)	0,00	75	-153,00(-84,25;-250,50)	
Valor de p**	0,107	0,814				
Hipertensos (n=68)	179,00 (117,50-284,50)	52,00 (33,50-81,00)	0,00	71	-124,00(-71,00;-238,50)	<b>0,730**</b>
Não hipertensos (n=13)	179,50 (60,75-314,75)	46,50 (22,75-76,75)	0,015	74	-131,50(-7,75;-245,5)	
Valor de p**	0,852	0,563				
Tabagistas (n=9)	268,00(215,00-477,00)	68,00 (34,00-161,50)	0,021	75	-236,00(-61,00;-324,00)	<b>0,385**</b>
Ex-tabagistas (n=18)	179,50 (97,50-276,75)	64,00 (42,75-88,25)	0,001	64	-103,00(-38,75;-205,00)	
Não tabagistas (n=54)	164,00 (117,00-283,75)	45,50 (31,75-72,00)	0,00	72	-122,50(-72,50;-234,25)	
Valor de p***	0,165	0,201				

IMC $\leq$ 25 kg/m <sup>2</sup> (n=18)	163,00 (82,50-210,75)	63,00 (31,75-99,00)	0,005	61	- 87,00(4,25 ;-124,00)	<b>0,028</b> ***
IMC 26 - 30 kg/m <sup>2</sup> (n=21)	174,00 (101,00- 335,00)	51,00 (34,50-74,00)	0,00	71	-118,00(- 69,00;- 274,00)	
IMC > 30 kg/m <sup>2</sup> (n=42)	208,00 (147,50- 147,50)	48,00 (30,50-78,75)	0,00	77	-158,00(- 78,75;- 249,25)	
Valor de p***	0,173	0,591				
Colesterol Total $\leq$ 200 mg/dL(n=52)	176,00 (111,50- 290,50)	51,00 (31,00-69,75)	0,00	71	-114,50(- 42,00;- 239,75)	0,712 **
Colesterol Total > 200 mg/dL (n=29)	179,00 (149,50- 296,00)	54,00 (36,50-89,50)	0,00	70	-130,00(- 81,00;- 220,00)	
Valor de p**	0,708	0,183				
Colesterol LDL $\leq$ 130 mg/dL(n=60)	188,00(116,25-306,25)	51,00 (31,25-72,00)	0,00	73	-131,50(- 44,00;- 237,25)	0,817 **
Colesterol LDL >130 mg/dL(n=21)	160,00 (139,50- 253,50)	54,00 (36,00-99,00)	0,00	66	-124,00(- 76,00;- 215,00)	
Valor de p**	0,734	0,274				
Triglicéridos $\leq$ 150 mg/dL (n=49)	174,00 (117,00- 284,50)	46,00 (31,50-74,50)	0,00	74	-118,00(- 47,50;- 214,00)	0,543 **
Triglicéridos > 150 mg/dL(n=32)	179,00(118,00-371,25)	52,50 (39,75-87,75)	0,00	71	-131,00(- 69,50;- 300,25)	
Valor de p**	0,602	0,317				
HbA <sub>1c</sub> < 7,0 % (n=24)	174,00 (119,50- 239,50)	51,00 (23,00-66,50)	0,00	71	-121,00(- 71,00;- 180,25)	0,914 ***
HbA <sub>1c</sub> 7,0 – 9,9 % (n=40)	165,50(116,75-298,50)	50,50(35,75-81,00)	0,00	69	-128,00(- 51,75;- 247,75)	
HbA <sub>1c</sub> $\geq$ 10,0 % (n=17)	219,50(102,75-361,25)	65,50(32,25-90,00)	0,025	70	-148,00(- 19,25;- 274,75)	



Valor de p***	0,674	0,312				
GP111a alelo PI <sup>A1A1</sup> (n=60)	179,50(120,25-325,75)	55,50(33,25-87,75)	0,00	69	-137,00(-56,75;-259,00)	0,247**
GP111a ao menos 1 alelo PI <sup>A2</sup> (n=21)	156,00 (116,50-216,00)	36,00 (30,50-57,00)	0,00	77	-100,00(-57,00;-157,00)	
Valor de p**	0,121	<b>0,034</b>				
Polimorfismo COX-1 ausente (n=65)	179,00 (124,50-284,50)	46,00 (31,50-85,50)	0,000	74	-124,00(-57,00;-220,00)	0,873**
Polimorfismo COX-1 presente (n=16)	180,00 (100,50-316,25)	53,00 (48,50-72,00)	0,001	71	-116,00(-50,00;-276,25)	
Valor de p**	0,822	0,390				

\* teste Wilcoxon \*\* teste Mann Whitney \*\*\* teste Kruskal Wallis. IMC: índice de massa corporal; HbA<sub>1c</sub>: hemoglobina glicada; GP111a: glicoproteína 111a; COX-1: ciclooxigenase 1

A **Tabela 5.5** mostra os resultados da análise estatística de variáveis estudadas, utilizando redução de  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinários como variável resposta. O estudo de três variáveis apresentou valor de  $p \leq 0,20$ : idade ( $p=0,20$ ), índice de massa corporal ( $p=0,01$ ) e uso de hipoglicemiante oral ( $p=0,18$ ). Estas variáveis foram então selecionadas para análise pelo modelo de Regressão Logística Múltipla utilizando redução de  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinários como variável resposta (resultado na **Tabela 5.8**).

**Tabela 5.5 – Análise estatística utilizando redução de  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinários como variável resposta**

<b>Variáveis</b>	<b>Redução <math>\geq 50\%</math> nos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub></b>		<b>OR</b>	<b>Valor p</b>	<b>IC</b>
	<b>Sim (n %)</b>	<b>Não (n %)</b>			
<b>Sexo</b>					
Feminino (n %)	45 (77,6)	13 (22,4)	1,541	0,450	0,513; 4,466
Masculino (n %)	16 (69,6)	7 (30,4)	1	(1)	
<b>Idade</b>			<b>Beta=</b>	<b>0,202</b>	-0,091; 0,0188
Média (anos $\pm$ DP)	56,39 $\pm$ 10,4	59,65 $\pm$ 9,05	-0,036	(4)	
<b>Fumante</b>					
Não (n %)	42 (77,8)	12 (22,2)	1	0,738	0,177; 1,844 0,183; 5,460
Ex-fumante (n %)	12 (66,7)	6 (33,3)	0,571	(2)	
Sim (n %)	7 (77,8)	2 (22,2)	1		
<b>Hipertensão</b>					
Sim (n %)	53 (76,8)	16 (23,2)	1,656	0,478	0,441; 6,225
Não (n %)	8 (66,7)	4 (33,3)	1	(2)	
<b>IMC</b>					
Até 25 kg/m <sup>2</sup> (n %)	10 (50,0)	10 (50,0)	1		1,317; 0,923 1,448; 7,271
26 a 30 kg/m <sup>2</sup> (n %)	21 (84,0)	4 (16,0)	5,250	<b>0,010</b>	
> 30 kg/m <sup>2</sup> (n %)	30 (83,3)	6 (16,7)	5,000	(1)	
<b>Uso de estatina</b>					
Sim (n %)	34 (75,6)	11 (24,4)	1,030	0,954	0,373-2,845
Não (n %)	27 (75,0)	9 (25,0)	1	(1)	
<b>Uso de insulina</b>					
Sim (n %)	37 (74,0)	13 (26,0)	0,830	0,729	0,290; 2,379
Não (n %)	24 (77,4)	7 (22,6)	1	(1)	
<b>Uso de HGO</b>					
Sim (n %)	52 (78,8)	14 (21,2)	2,476	<b>0,183</b>	0,754; 8,137
Não (n %)	9 (60,0)	6 (40,0)	1	(2)	

<b>HbA<sub>1c</sub></b>					
< 7,0 % (n %)	19 (76,0)	6 (24,0)	1		
7,0 a 9,9 % (n %)	31 (73,8)	11 (26,2)	0,890	0,980	0,283; 2,802
≥ 10,0 % (n %)	6 (75,0)	2 (25,0)	0,947	(1)	0,150; 5,994
<b>Plaquetas</b>					
Média /mm <sup>3</sup> ± DP	237,36 ±57,17	230,15 ±57,68	Beta= 0,002	0,627 (4)	-0,007; 0,109
<b>Colesterol total</b>					
>200 mg/dL (n %)	22 (75,9)	7 (24,1)	1,048	0,931	0,364; 3,015
≤200 mg/dL (n %)	39 (75,0)	13 (25,0)	1	(1)	
<b>Colesterol HDL</b>					
<40 mg/dL (n %)	47 (72,3)	18 (27,7)	0,373	0,333	0,077; 1,80
≥40 mg/dL (n %)	14 (87,5)	2 (12,50)	1	(2)	
<b>Colesterol LDL</b>					
>130 mg/dL (n %)	16 (76,2)	5 (23,8)	1,067	0,913	0,334; 3,409
≤130 mg/dL (n %)	45 (75,0)	15 (25,0)	1	(1)	
<b>Triglicérides</b>					
>150 mg/dL (n %)	24(75,0)	8(25,0)	0,973	0,958	0,347; 2,730
≤ 150 mg/dL (n %)	37(75,5)	12 (24,5)	1	(1)	
<b>Triglicérides</b>					
Mediana mg/dL	122,00	133,50	Beta= -0,001	0,738 (5)	-0,008; 0,006
Intervalo interquartilico	(176,50-93,50)	(209,75-89,50)			
<b>GP1IIa</b>					
Alelo PI <sup>A1A1</sup> (n %)	44 (73,3)	16 (26,7)	1	0,411	0,021; 6,164 0,498; 7,552
Alelo PI <sup>A2A2</sup> (n %)	1 (50,0)	1 (50,0)	0,364	(2)	
Alelo PI <sup>A1A2</sup> (n %)	16 (84,2)	3 (15,8)	1,939		
<b>GP1IIa</b>					
Alelo PI <sup>A1A1</sup> (n %)	44 (73,3)	16 (26,7)	1	0,486	0,452; 5,289
Ao menos 1 alelo PI <sup>A2</sup> (n %)	17 (81,0)	4(19,00)	1,545	(1)	

Polimorfismo COX-1					
ausente	49 (75,4)	16 (24,6)	1	1,000 (2)	0,277-3,469
presente	12 (75,0)	4 (25,0)	0,980		
Grupo sanguíneo					
O (n %)	30 (78,9)	8 (21,1)	1,452	0,475	0,520; 4,049
“Não O” (n %)	31 (72,1)	12(27,9)	1	(1)	
Variação Dímero-D					
Diminuiu (n %)	20(74,1)	7 (25,9)	1	0,695	
Não alterou (n %)	18(81,8)	4 (18,2)	1,575	(1)	0,395; 6,284
Aumentou (n %)	23 (71,9)	9 (28,1)	0,894		0,282; 2,840

1 - Teste Qui-quadrado Pearson assintótico; 2 - Teste Qui-quadrado Pearson exato; 3 - Teste exato de Fischer; 4 - Teste t; 5 - Teste Mann Whitney.

DP= desvio padrão; HbA<sub>1c</sub> = Hemoglobina glicada; HGO = hipoglicemiante oral; IMC = Índice de massa corporal

Na **Tabela 5.6** está apresentada a distribuição dos pacientes com idade menor que 50 anos e igual ou maior que 50 anos, em relação à redução de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub>, não tendo sido observada diferença significativa entre os grupo (p=0,542).

**Tabela 5. 6 - Distribuição dos pacientes em relação à redução de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário por idade dos pacientes (n=81)**

<i>Idade</i>	<i>Redução ≥ 50% nos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub></i>		<i>Valor de p*</i>
	<i>Sim</i> (n %)	<i>Não</i> (n %)	
< 50 anos	14 (82,4)	3 (17,6)	0,542
≥ 50 anos	47 (73,4)1	7 (26,6)	

\*Teste exato de Fisher

A **Tabela 5.7** mostra a distribuição de dois subgrupos de pacientes formados em relação ao tempo decorrido entre o diagnóstico de DM2 e a inclusão do paciente no estudo (< 5 anos e ≥ 5 anos) em relação à redução de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub>. Pode ser observado que não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (p=0,635). A mediana do tempo de diagnóstico de DM2 dos pacientes que conseguiram diminuir os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário em 50% ou mais foi de 4,0 anos e dos que não conseguiram também foi de 4,0 anos (intervalos interquartílicos 3,0-6,0 e 3,0-7,5 respectivamente) e o valor de p encontrado para a análise dos dois grupos foi de 0,812.

**Tabela 5. 7 - Distribuição dos pacientes em relação à redução de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário por tempo de diagnóstico de DM2 (n=81)**

<i>Tempo de diagnóstico de DM2</i>	<i>Redução ≥ 50% nos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub></i>		<i>Valor de p*</i>
	<i>Sim</i> (n %)	<i>Não</i> (n %)	
< 5 anos	36 (73,5)	13 (26,5)	0,635
≥ 5 anos	25 (78,1)	7 (21,9)	

\*Qui-quadrado de Pearson assintótico

A análise pelo modelo de Regressão Logística Múltipla foi realizada com as variáveis que apresentaram valor de  $p \leq 0,20$  na análise univariada: idade ( $p=0,20$ ), índice de massa corporal ( $p=0,01$ ) e uso de hipoglicemiante oral ( $p=0,18$ ) (**Tabela 5.5**). Na **Tabela 5.8** estão apresentados os resultados obtidos para o índice de massa corporal que foi a única variável a apresentar resultado significativo ( $p=0,010$  para IMC entre 26 e 30 kg/m<sup>2</sup> e  $p=0,009$  para IMC maior que 30 kg/m<sup>2</sup>). A adequação do modelo foi verificada pelo teste Hosman e Lemeshow. Foi encontrado valor de  $p=0,338$ , mostrando que o modelo logístico ajustou bem os dados.

**Tabela 5.8 - Modelo de Regressão Logística Múltipla utilizando redução de  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinários como variável resposta**

<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Redução <math>\geq 50\%</math> nos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub></b>		<b>Odds ratio (OR)</b>	<b>CI 95%OR</b>	<b>Valor de p*</b>
	<b>Sim (n %)</b>	<b>Não (n %)</b>			
$\leq 25$	10 (50,0)	10 (50,0)	1		
26 - 30	21 (84,0)	4 (16,0)	6,939	1,592;30,243	0,010
> 30	30 (83,3)	6 (16,7)	5,510	1,531;19,836	0,009

\* teste Hosmer e Lemeshow (p = 0,338).

IMC = Índice de massa corporal

### 5.3 Marcador de estado inflamatório (PCRus)

Os valores de Proteína C Reativa ultra-sensível não apresentaram distribuição normal e, portanto, seus resultados estão apresentados em mediana e intervalo interquartilico na **Tabela 5.9**. Pode ser observado que não houve diferença significativa entre os valores encontrados para as amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de AAS (p=0,171).

**Tabela 5.9 - Valores de Proteína C Reativa ultra sensível (PCRus) antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81)**

<b>PCRus</b>	<b>Mediana mg/L</b>	<b>Intervalo Interquartilico mg/L</b>
Antes do uso de AAS	3,06	1,61-6,92
Aos 15 dias de uso diário de 100mg AAS	2,91	1,35-6,06
Valor de p*	0,171	

\*Teste Wilcoxon

Na **Tabela 5.10** está apresentada a distribuição dos pacientes em relação à avaliação de risco de cardiovascular pelo valor de Proteína C Reativa ultra-sensível antes e aos 15 dias de uso diário de AAS, podendo ser observado que um terço dos pacientes apresentava indicativo de processo inflamatório/infeccioso antes e após o uso de AAS.

**Tabela 5.10 – Distribuição dos pacientes em relação à avaliação de risco cardiovascular pelo valor de Proteína C Reativa ultra-sensível antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81)**

<b>Uso de AAS</b>	<b>Risco baixo</b> ( <i>&lt; 1,00 mg/L</i> ) ( <i>n %</i> )	<b>Risco moderado</b> ( <i>1,00 a 3,00 mg/L</i> ) ( <i>n %</i> )	<b>Risco alto</b> ( <i>&gt;3,00 mg/L</i> ) ( <i>n %</i> )	<b>Processo inflamatório / infeccioso</b> ( <i>&gt;5,00 mg/L</i> ) ( <i>n %</i> )
Antes (n %)	13 (16,0)	26 (32,1)	15 (18,6)	27 (33,3)
Após (n %)	15 (18,6)	27 (33,3)	12 (14,8)	27 (33,3)

Comparando os valores de PCRus de cada paciente obtidos nas amostras colhidas antes e após o uso de 100mg de AAS diariamente, foi observado que 21 pacientes diminuiram o risco cardiovascular passando para uma categoria inferior, enquanto que 15 pacientes aumentaram este risco, estando inseridos numa categoria superior após os 15 dias de uso do AAS. Por outro lado, 16 pacientes que apresentaram inicialmente um valor de PCRus referente a estado inflamatório e/ou infeccioso ( $> 5,00\text{mg/L}$ ) e 5 que apresentaram risco aumentado ( $> 3,00\text{mg/L}$ ) não mudaram de categoria, enquanto que 9 pacientes que apresentaram risco cardiovascular baixo ( $< 1,00\text{mg/L}$ ) assim permaneceram (**Tabela 5.11**).

**Tabela 5.11 – Avaliação do *status* de risco de cardiovascular pelo valor de Proteína C Reativa ultra-sensível aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS em comparação ao *status* encontrado antes do uso de AAS (n=81)**

<b>Risco cardiovascular</b>	<b>Número de pacientes</b>
Diminuição do risco	21
Aumento do risco	15
Manutenção do risco	
Baixo	9
Moderado	15
Alto	5
Processo inflamatório/infeccioso	16

A **Tabela 5.12** mostra a distribuição dos pacientes em relação ao resultado de Proteína C Reativa ultra-sensível < 3,00mg/L e ≥ 3,00mg/L antes e aos 15 dias de uso diário de AAS, podendo ser observado que não houve diferença entre os grupos (p=0,815).

**Tabela 5.12 – Distribuição dos pacientes em relação ao resultado de Proteína C Reativa ultra-sensível < 3,00mg/L e ≥ 3,00mg/L antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81)**

<b>Valor de PCR us</b>	<b>Pacientes (n %)</b>	<b>Valor de p*</b>
Antes do uso de AAS		0,815
< 3,00mg/L	40 (49,4)	
≥ 3,00mg/L	41 (50,6)	
Depois do uso de AAS		
< 3,00mg/L	42 (51,9)	
≥ 3,00mg/L	39 (48,1)	

\*Teste McNemar



A análise da correlação entre o valores das medianas de PCRus e 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, encontrados para as amostras colhidas antes do uso de AAS, pelo teste de correlação de Spearman apresentou valor de 0,108 com p=0,336, mostrando que não há correlação. A mesma análise de correlação realizada com os valores das medianas destes dois parâmetros medidos nas amostras colhidas aos 15 dias de uso diário de AAS mostrou correlação de -0,065 com valor de p=0,566, também indicando ausência de correlação.

A distribuição dos pacientes em relação à redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário com relação aos valores de PCRus < 3,00mg/L e ≥ 3,00mg/L está apresentada na **Tabela 5.13** onde pode ser verificado que não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (p=0,274).

**Tabela 5.13 - Distribuição dos pacientes em relação à redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e valores de Proteína C Reativa ultra-sensível (PCRus) (n=81)**

<i>PCRus</i>	<i>Redução ≥ 50% nos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub></i>		<i>Valor de p*</i>
	<i>Sim (n %)</i>	<i>Não (n %)</i>	
< 3,00mg/L	28 (70,0)	12 (30,0)	0,274
≥ 3,00mg/L	33 (80,5)	8 (19,5)	

\*Qui-quadrado de Pearson assintótico

#### **5.4 Marcador de adesão ao tratamento (metabólitos do AAS)**

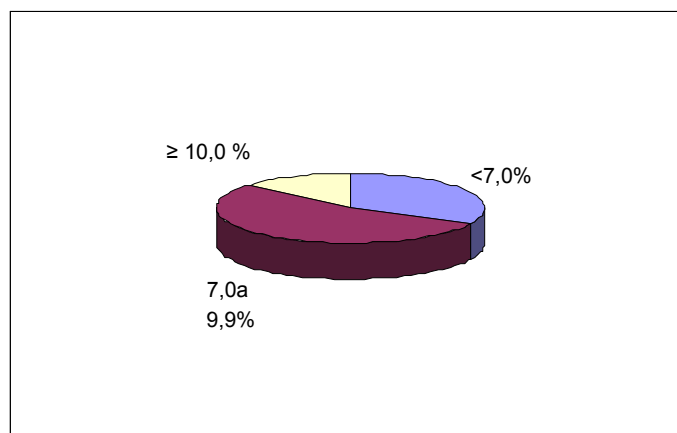
Das 162 amostras analisadas (81 colhidas antes do uso de AAS e 81 colhidas aos 15 dias de uso do medicamento), em apenas quatorze foi possível detectar um dos metabólitos do ácido acetilsalicílico. Para estas amostras pode-se afirmar que os pacientes fizeram uso da medicação, pois todas essas amostras positivas correspondiam à segunda coleta de sangue. Em dezessete amostras foram identificados interferentes nos tempos de retenção dos compostos analisados, o que

resultou em uma análise inconclusiva para a presença de ácido salicílico (AHH) ou ácido salicílico (AS). Três amostras não foram injetadas por falha mecânica do equipamento, e não puderam ser analisadas, pois não havia quantidade de amostra suficiente para a reanálise. Uma amostra não foi analisada, pois a quantidade de plasma era inferior ao volume de tomada de amostra (450 $\mu$ L). Cento e vinte e sete amostras não apresentaram pico no cromatograma por razões diversas e entre elas estavam amostras colhidas antes e depois do uso de AAS. Isto era esperado em setenta e uma amostras, porque das oitenta e uma amostras colhidas antes do uso de AAS, sete apresentaram interferentes e três não foram analisadas.

## 5.5 Parâmetros bioquímicos, hematológicos e moleculares

### 5.5.1 Marcador de controle glicêmico (HbA<sub>1c</sub>)

Os valores de HbA<sub>1c</sub> não apresentaram distribuição normal. A mediana foi de 8,0% e o intervalo interquartil 8,8 - 6,7%. Não foi possível obter os valores de HbA<sub>1c</sub> de seis pacientes. Valores de HbA<sub>1c</sub> inferiores a 7,0% foram encontrados em vinte e quatro pacientes (32%). Quarenta e um pacientes (55%) apresentaram valores entre 7,0 e 9,9% e dez (13%) estavam com níveis de HbA<sub>1c</sub> iguais ou superiores a 10,0% (Figura 5.2).



**Figura 5.2 - Distribuição dos valores de Hemoglobina A<sub>1c</sub> entre os pacientes (n=75)**

As medianas dos valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário encontrados nas amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de AAS dos três subgrupos de pacientes formados de acordo com seus valores de HbA<sub>1C</sub> (< 7,0%, 7,0 a 9,9% e ≥ 10,0%) estão na **Tabela 5.4**, onde pode ser visto que não houve diferença significativa entre os grupos. Analisando os valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário encontrados para o “antes” e “depois” pode ser observado que houve redução com significado estatístico nos três grupos (p=0,00, p=0,00 e p=0,025 respectivamente).

Analisando a distribuição do número de pacientes divididos em subgrupos conforme seus valores de HbA<sub>1C</sub> (< 7,0%, 7,0 a 9,9% e ≥ 10,0%) em relação à redução ou não de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, pode ser observado que não houve diferença entre os subgrupos, tendo sido encontrado valor de p=0,980 (**Tabela 5.5**).

### **5.5.2 Marcador de fibrinólise (dímero-D)**

Os valores de dímero-D encontrados para os pacientes nas amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg AAS não apresentaram distribuição normal. As medianas e intervalos interquartílicos estão apresentados na **Tabela 5.14**, podendo ser observado que os valores encontrados antes e depois do uso de AAS não apresentaram diferença significativa (p=0,558).

**Tabela 5.14 - Resultados das análises de dímero-D encontrados para as amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (n=81)**

<b><i>Momento da coleta da amostra</i></b>	<b><i>Dímero-D (mediana ng/mL)</i></b>	<b><i>Intervalo interquartilico</i></b>	<b><i>Valor p*</i></b>
Antes do uso de AAS	325,00	207,00 – 502,00	0,558
Aos 15 dias de uso de AAS	326,00	218,00 – 502,00	

\* teste Wilcoxon;

Na **Tabela 5.15** estão apresentados os valores das medianas de dímero-D dos pacientes que apresentaram redução  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e dos que não alcançaram esta redução. Não foi observada diferença significativa entre estes dois grupos ( $p=0,168$ ).

**Tabela 5.15 – Medianas dos valores de dímero-D encontrados nas amostras colhidas aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS analisadas em relação à redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário (n=81)**

<b>11-dhTXB<sub>2</sub></b>	<b>Dímero-D</b> ( <i>mediana</i> ng/mL)	<b>Intervalo</b> <b>interquartilico</b>	<b>Valor p*</b>
Redução $\geq 50\%$	283,00	207,500 - 496,50	0,168
Redução $< 50\%$	385,50	251,50 - 534,50	

\* Teste Mann Whitney

Na **Tabela 5.5** é possível analisar a distribuição dos pacientes em relação à redução ou não de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e à alteração de seus valores de dímero-D aos 15 dias de uso de AAS (diminuição, sem alteração e aumento). Pode ser observado que não houve diferença entre os grupos, pois o valor encontrado para p foi de 0,695.

A correlação entre os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e dímero-D antes e depois do uso de AAS está na **Tabela 5.16**, onde pode-se observar que foi encontrada correlação apenas entre os valores de dímero-D das amostras colhidas antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso deste medicamento ( $p=0,00$ ). Não foi encontrada correlação entre os níveis de dímero-D e 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas “antes” e depois” ( $p=0,592$  e  $p=0,560$  respectivamente) e nem entre os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas nos dois momentos ( $p=0,115$ ).

**Tabela 5.16 - Correlação entre os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e dímero-D (Di-D) antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS**

	<b>Correlação</b>	<b>Valor de p*</b>
Di-D antes X Di-D depois	0,791	0,000
Di-D antes X 11-dhTXB <sub>2</sub> antes	-0,060	0,592
Di-D depois X 11-dhTXB <sub>2</sub> depois	0,066	0,560
11-dhTXB <sub>2</sub> antes X 11-dhTXB <sub>2</sub> depois	0,177	0,115

\* Correlação de Spearman

Na **Tabela 5.17** está apresentada a correlação entre os níveis de dímero-D e hemoglobina glicada, podendo ser observado que não foi encontrada correlação entre os valores de dímero-D das amostras colhidas antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso deste medicamento e o valor de hemoglobina glicada encontrado antes do uso de AAS ( $p=0,558$  e  $p=0,498$ , respectivamente).

**Tabela 5.17 - Correlação entre os níveis de dímero-D antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS e hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>)**

	<b>Correlação</b>	<b>Valor p*</b>
Dímero-D antes X HbA <sub>1c</sub>	0,069	0,558
Dímero-D depois X HbA <sub>1c</sub>	0,080	0,498

\* Correlação de Spearman

### **5.5.3 Contagem de plaquetas**

Os valores das contagens de plaquetas apresentaram distribuição normal. Sua média foi de 236.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> com desvio padrão de  $\pm 57.000$ . Três pacientes estavam com o número de plaquetas abaixo do valor de referência (128.000,

138.000 e 145.000/mm<sup>3</sup>) e apenas um apresentou número acima do valor de referência (404.000/mm<sup>3</sup>).

A **Tabela 5.18** mostra a distribuição dos pacientes em subgrupos de acordo com a contagem de plaquetas (< 250.000/mm<sup>3</sup> e ≥ 250.000/mm<sup>3</sup>) em relação à redução ou não de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário. Nenhuma diferença foi observada entre os dois subgrupos (p=0,533).

**Tabela 5. 18 - Distribuição dos pacientes em relação à redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e número de plaquetas (n=81)**

<b>Plaquetas</b>	<b>Redução ≥ 50% nos níveis urinários de 11-dhTXB<sub>2</sub></b>		<b>Valor de p*</b>
	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	
< 250.000/mm <sup>3</sup>	38 (73,1)	14 (26,9)	0,533
≥ 250.000/mm <sup>3</sup>	23 (79,3)	6 (20,7)	

\*Qui-quadrado de Pearson assintótico

Na **Tabela 5.5** estão apresentadas as médias das contagens de plaquetas dos pacientes que apresentaram redução ≥ 50% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e dos que não alcançaram esta redução, não tendo sido encontrada diferença significativa entre os grupos (p=0,627).

#### **5.5.4 Classificação de grupo sanguíneo**

A classificação reversa do grupo sanguíneo dos pacientes mostrou que 38 pacientes (47%) pertenciam ao grupo “O” e que 43 (53%) eram do grupo “não-O”. A análise da distribuição dos pacientes dos grupos “O” e “não-O” conforme a redução ou não de 50% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário pode ser visto na **Tabela 5.5**. O valor encontrado para p (0,475) indica que não foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

Na **Tabela 5.19** estão apresentadas as medianas dos valores de dímero-D encontrados para os grupos “O” e “não-O” antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS. Ambos os grupos não apresentaram diferença significativa entre os valores ( $p=0,369$  e  $p=0,080$  respectivamente).

**Tabela 5.19 - Medianas dos valores de dímero-D das amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS de acordo com o grupo sanguíneo (“O” x “não-O”) dos pacientes**

<i>Variáveis</i>	<i>Mediana</i> (ng/mL)	<i>Intervalo</i> <i>Interquartilico</i>	<i>Valor p*</i>
Dímero-D antes para Grupo “O”	390,50	214,25 - 552,25	0,369
Dímero-D depois para Grupo “O”	302,50	220,50 - 562,25	
Dímero-D antes para Grupo “não-O”	281,00	207,00 - 429,00	0,080
Dímero-D depois para Grupo “não-O”	362,00	213,00 - 477,00	

\*Teste Wilcoxon

Os níveis de dímero-D encontrados nas amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS para os grupos “O” e “não-O” apresentaram correlação ( $p=0,00$ ) (**Tabela 5.20**).

**Tabela 5.20 - Correlação entre os níveis de dímero-D antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS para cada grupo sanguíneo dos pacientes (“O” e “não-O”)**

	<i>Correlação</i>	<i>Valor p*</i>
Dímero-D antes X dímero-D depois Grupo “O”	0,829	0,00
Dímero-D antes X dímero-D depois Grupo “não-O”	0,780	0,00

\*Correlação de Spearman.

### **5.5.5 Determinação do colesterol total e fracionado**

O perfil lipídico dos pacientes está explicitado na **Tabela 5.21**. Todos os parâmetros apresentaram distribuição não-normal e por isto o resultado está expresso em mediana e intervalo interquartilico.

**Tabela 5.21 - Perfil lipídico dos pacientes**

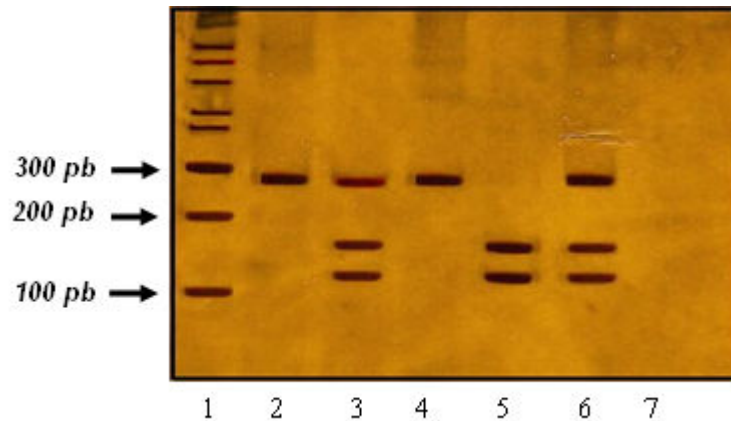
<b><i>Parâmetro</i></b>	<b><i>Resultado</i></b>
Colesterol Total (mediana mg/dL)	189,00
Intervalo Interquartilico (mg/dL)	160,50-214,50
Colesterol HDL (mediana mg/dL)	49,00
Intervalo Interquartilico (mg/dL)	42,00-58,50
Colesterol LDL (mediana mg/dL)	107,00
Intervalo Interquartilico (mg/dL)	90,50-131,00
Triglicérides (mediana mg/dL)	130,00
Intervalo Interquartilico (mg/dL)	93,00-178,00

### **5.5.6 Estudo do polimorfismo do gene da GPIIIa (PI<sup>A</sup>)**

Na **Figura 5.3** pode ser visto um gel de poliacrilamida corado por nitrato de prata, mostrando as bandas encontradas após eletroforese do material obtido após PCR e digestão, que identificam o polimorfismo da GPIIIa (PI<sup>A</sup>).



**Figura 5.3 – Identificação do polimorfismo do gene da Glicoproteína GPIIIa (PI<sup>A</sup>)**



Gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR, seguida de digestão com a endonuclease de restrição *MspI* e eletroforese. Na canaleta 1, padrão de peso molecular; na canaleta 7, branco da reação; na canaleta 5, bandas de 157 e 125pb (indivíduo homozigoto para o polimorfismo); nas canaletas 3 e 6, bandas de 282, 157 e 125pb (indivíduo heterozigoto para o polimorfismo); nas canaletas 2 e 4, banda de 282pb (indivíduos carreadores do alelo selvagem em homozigose).

Na **Tabela 5.22** está apresentada a distribuição do polimorfismo da GPIIIa (PI<sup>A</sup>) entre os pacientes do estudo, sendo que o polimorfismo foi encontrado em 25,93% dos pacientes (23,46% em heterozigose e 2,47% em homozigose).

**Tabela 5.22 - Polimorfismo da Glicoproteína GPIIIa (PI<sup>A</sup>) (n= 81)**

<b>Polimorfismo</b>	<b>Participantes</b>
Ausente (alelo PI <sup>A1A1</sup> ) (n %)	60 (74,07)
Presente em heterozigose (alelo PI <sup>A1A2</sup> ) (n %)	19 (23,46)
Presente em homozigose (alelo PI <sup>A2A2</sup> ) (n %)	2 (2,47)

Na **Tabela 5.4** estão apresentadas as medianas dos valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS encontradas para os pacientes em que o polimorfismo da GPIIIa estava ausente e

para aqueles que apresentaram o polimorfismo. Ambos os grupos apresentaram diferença significativa entre os valores das amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso de AAS ( $p=0,00$ ). Analisando as amostras colhidas antes do uso de AAS dos dois grupos, não foi encontrada diferença significativa entre as medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário ( $p=0,121$ ). A análise das medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas aos 15 dias de uso diário de AAS dos dois grupos (polimorfismo ausente e presente), mostrou diferença significativa entre elas ( $p=0,034$ ). No entanto, quando avaliada a diferença entre as medianas das amostras colhidas nos dois momentos (antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso) não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes PI<sup>A1A1</sup> e aqueles com pelo menos um alelo PI<sup>A2</sup> ( $p=0,247$ ) (coluna 6 da **Tabela 5.4**). Na **Tabela 5.5** é possível analisar a distribuição dos pacientes conforme a presença ou não do polimorfismo da GP111a em relação à redução ou não de 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário. Observa-se que não houve diferença entre os grupos, pois o valor encontrado para  $p$  foi de 0,486.

### **5.5.7 Estudo do polimorfismo do gene da COX-1**

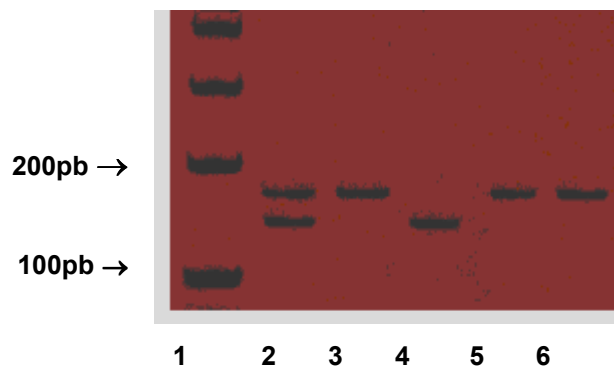
Na **Tabela 5.23** está apresentada a distribuição do polimorfismo da COX-1 entre os pacientes do estudo, sendo que o polimorfismo foi encontrado em 19,75% dos pacientes (12,35% em heterozigose e 7,40% em homozigose).

**Tabela 5.23 - Polimorfismo da Ciclooxygenase 1 (COX-1) (n= 81)**

<b><i>Polimorfismo</i></b>	<b><i>Participantes</i></b>
Ausente (n %)	65 (80,25)
Presente em heterozigose (n %)	10 (12,35)
Presente em homozigose (n %)	6 (7,40)

Na **Figura 5.4** pode ser visto um gel de poliacrilamida corado por nitrato de prata mostrando as bandas encontradas após eletroforese do material obtido após PCR e digestão que identificam o polimorfismo da COX-1.

**Figura 5.4** – Identificação do polimorfismo do gene da Ciclooxygenase 1 (Cox-1)



Gel de poliacrilamida corado pela prata, obtido após PCR, seguida de digestão com a endonuclease de restrição *Acil* e eletroforese. Na canaleta 1, padrão de peso molecular; na canaleta 2, bandas de 178 e 158pb (indivíduo heterozigoto para o polimorfismo); nas canaletas 3,5 e 6, banda de 178pb (indivíduos homozigotos para o polimorfismo); e na canaleta 4, banda de 158pb (indivíduo carreador do alelo selvagem em homozigose). O fragmento de 20pb é perdido durante a corrida eletroforética.

A **Tabela 5.4** mostra as medianas dos valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso de AAS encontradas para os pacientes em que o polimorfismo da COX-1 estava ausente ou presente. Ambos os grupos apresentaram diferença significativa entre os valores das amostras colhidas antes e aos 15 dias de uso de AAS ( $p=0,00$ ). Analisando as amostras colhidas antes dos dois grupos (polimorfismo ausente e presente), e aos 15 dias de uso de diário de AAS também destes dois grupos, não foi encontrada diferença significativa entre as medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário ( $p=0,822$  e  $p=0,390$  respectivamente). Na **Tabela 5.5** está apresentada a distribuição dos pacientes com e sem o polimorfismo em relação à redução  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário. Pode ser observado que não houve diferença entre os grupos, ( $p=1,000$ ).

**6.1 Perfil dos participantes do estudo**

A população estudada reflete uma mínima parte do universo dos pacientes atendidos pela saúde pública em nosso país, compreendendo pacientes encaminhados pelos postos de saúde municipais e estaduais para um atendimento especializado no Ambulatório de Diabetes Mellitus 2 do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte, por terem diagnóstico de diabetes mellitus 2 e necessitarem de acompanhamento de um médico endocrinologista.

Cumprе ressaltar que foram adotados cuidados essenciais para se evitar a ocorrência de erros pré-analíticos e outros, além de vieses. Assim, os critérios de seleção foram sistematicamente os mesmos. Pacientes foram selecionados pela mesma equipe, composta por profissionais farmacêuticos que se encarregaram da entrevista, coleta de dados dos prontuários preenchidos pelos médicos, acompanhamento da adesão ao tratamento por parte do paciente através de contato telefônico e coleta das amostras biológicas. Amostras de soro, plasma e de DNA foram obtidas utilizando os mesmos protocolos e com o rigor necessário. O armazenamento das amostras seguiu protocolo recomendado por fabricantes dos kits e também o adotado por pesquisadores que desenvolveram estudos empregando as análises realizadas neste estudo (EIKELBOOM et al., 2002, 2008). Esta variável não afetou os resultados uma vez que as amostras foram coletadas com intervalos de apenas quinze dias e armazenadas de forma idêntica.

As análises foram realizadas após treinamento do operador, com relação não apenas à corrida dos testes, mas também quanto ao manuseio dos equipamentos, sendo que todos os testes de um determinado analito foram realizados pelo mesmo operador.

A análise do perfil dos pacientes incluídos neste estudo nos mostra uma predominância de mulheres (71,6%), que pode ser interpretada como sinal de maior

preocupação e cuidados com a saúde por parte das mulheres bem como um indicativo de maior disponibilidade para participar de estudos de pesquisa. O estudo de Framingham mostrou, em 1979, que mulheres diabéticas apresentavam o mesmo risco de doença cardiovascular que os homens diabéticos, porém maior risco de mortalidade (KANDEL e McGEE, 1979). Portanto, é desejável que elas tenham consciência da necessidade de cuidar da saúde para evitar as conseqüências indesejáveis do diabetes.

A análise dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinários apresentados na **Tabela 5.4** mostra que antes do uso do AAS, os homens apresentavam níveis menores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário (mediana=151,00 pg/mg creatinina) do que as mulheres (mediana=204,00 pg/mg creatinina), embora não houvesse diferença significativa ( $p=0,107$ ) e que após o uso do AAS os níveis eram equivalentes: mediana de 52,00 pg/mg creatinina para os homens e 51,00 pg/mg creatinina para mulheres ( $p=0,814$ ). Os homens tiveram 66% de redução nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e as mulheres 75% sendo que homens e mulheres apresentaram diferença significativa entre os níveis obtidos antes e depois do uso de AAS. No entanto, quando avaliada a diferença entre as medianas das amostras colhidas nos dois momentos (antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso) foi encontrada diferença significativa entre homens e mulheres, pois elas apresentaram maior redução nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário ( $p=0,026$ ). É possível que esta diferença tenha sido encontrada porque as mulheres tinham uma mediana mais elevada no início do estudo.

Gum et al. (2001), num estudo com 325 pacientes com doença cardiovascular encontraram maior prevalência de falha no tratamento com AAS entre mulheres (34,4%) quando comparada à prevalência entre os homens (17,3%). No entanto, o estudo de Gum et al. não se ateve apenas a pacientes diabéticos, o que dificulta a comparação com este estudo que foi realizado apenas com pacientes diabéticos.

A idade média dos pacientes, que foi de  $57,20 \pm 9,85$  anos, indica que a maioria deles está em idade produtiva embora tenha sido observado informalmente, pelos contatos pessoais e telefônicos, que poucas mulheres tinham atividade remunerada. Analisando a idade dos pacientes em relação à redução  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário foi possível verificar que a média de idade dos pacientes que apresentaram esta redução e dos que não a alcançaram não eram diferentes

( $p=0,202$ ) (**Tabela 5.5**). Os pacientes foram então divididos em dois grupos ( $< 50$  anos e  $\geq 50$  anos) e analisados quanto à redução ou não de 50% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário tendo sido observado que também não houve diferença entre os grupos ( $p=0,542$ ) (**Tabela 5.6**).

Gum et al. (2001), estudando pacientes com doença cardiovascular, encontraram associação entre idade mais elevada e falha no tratamento com AAS determinada por teste de agregação plaquetária, que é um teste diferente do empregado neste estudo. Já Fateh-Moghadan et al. (2005), num estudo com pacientes diabéticos, verificou que os pacientes que não responderam ao tratamento com AAS eram significativamente mais jovens do que aqueles que responderam ( $p<0,005$ ), e atribuiu esta constatação ao fato de que indivíduos mais jovens apresentam maior reposição plaquetária. No entanto, os pacientes do estudo de Fateh-Moghadan et al. apresentaram média de idade superior aos deste estudo ( $62,3\pm 8,9$  anos), com os pacientes que não responderam ao uso de 100mg de AAS apresentando média de idade de  $58,8\pm 10,4$  anos e os que responderam, com média de idade de  $64,0\pm 7,8$  anos. A diferença entre testes laboratoriais utilizados para avaliar falha no tratamento com AAS e no perfil de idade dos pacientes pode ser responsável pela diferença entre os resultados encontrados neste estudo e nos artigos citados. Talvez, se fosse possível desenvolver um estudo, em nosso meio, com um número maior de pacientes em que se formassem dois grupos com idades até 50 anos e acima de 50 anos de tamanho significativo, esta associação entre idade e falha no tratamento com AAS ficasse mais evidente.

A hipertensão foi encontrada em 85% dos pacientes. As medianas de níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário para pacientes hipertensos e não hipertensos antes do uso de AAS não foram diferentes, 179,00 e 179,50 pg/mg de creatinina, respectivamente, com  $p=0,852$ . Aos 15 dias de uso de AAS, as medianas também não diferiram (52,00 e 46,50 pg/mg de creatinina,  $p=0,563$ ). Os pacientes hipertensos apresentaram redução de 71% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e os não hipertensos, de 74% sendo que ambos os grupos apresentaram diferença significativa entre os níveis de antes e depois do uso de AAS (**Tabela 5.4**). A distribuição dos pacientes com e sem hipertensão em relação à redução  $\geq 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário não apresentou diferença significativa ( $p=0,478$ ) (**Tabela 5.5**). A ausência de diferença entre o comportamento dos hipertensos e dos não-hipertensos em relação aos

níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário pode ser devido ao uso de medicação hipotensora que tornaria iguais e adequados os níveis pressóricos de ambos os grupos. Esta situação pode reduzir o dano causado ao endotélio vascular pela pressão sistólica elevada. Meade e Brennan (2002) relataram que entre pacientes com risco de doença cardiovascular, aqueles com menor pressão sistólica (130mmHg) se beneficiavam mais com o uso de AAS na prevenção primário do que aqueles com maior pressão sistólica (> 145mmHg).

A mediana do tempo decorrido entre o diagnóstico e a inclusão do paciente no estudo (4,0 anos) não é uma variável muito confiável para análise, pois o momento de diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 pode não ser o mesmo do início da doença. Talvez por isto esta variável não tenha interferido na redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário (**Tabela 5.7**).

Apenas 11% dos pacientes se declararam tabagistas e 22% informaram já terem sido tabagistas, sendo que alguns destes ex-tabagistas revelaram que abandonaram o hábito depois do diagnóstico de diabetes. A mediana de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário dos pacientes tabagistas foi de 268,00pg/mg creatinina, para os ex-tabagistas foi de 179,50pg/mg creatinina e para os não-tabagistas, 164,00pg/mg creatinina, sendo que não foi encontrada diferença entre os três grupos (p=0,165). Após o uso de AAS, as medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário encontradas foram de 68,00 pg/mg creatinina para os tabagistas, 64,00pg/mg creatinina para os ex-tabagistas e 45,50pg/mg creatinina para os não tabagistas, não havendo diferença entre os três grupos (p=0,201) (**Tabela 5.5**). Os tabagistas apresentaram redução de 75% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, os ex-tabagistas 64% e os não-tabagistas, 72%. Cumpre ressaltar que os três grupos apresentaram diferença significativa entre os valores encontrados antes e depois do uso do AAS (**Tabela 5.4**).

Gum et al. (2001) não encontraram associação entre tabagismo e falha no tratamento com AAS medida por teste de agregação plaquetária. No entanto, Hung et al. (1995) mostraram que trombose plaquetária estimulada pelo tabagismo pode ser um mecanismo que contribui para eventos coronarianos agudos em fumantes e que este processo não é evitado pelo tratamento com AAS. Os efeitos pró-trombóticos do tabagismo podem ser causados pela liberação de catecolaminas e aumento na resposta plaquetária aos estímulos para agregação (HUNG et al., 1995).

A divergência entre resultados indica que, para o paciente tabagista, existe diferença entre o diagnóstico de falha no tratamento com AAS em termos clínicos e laboratoriais.

A mediana do índice de massa corporal (IMC) encontrado ( $30\text{kg/m}^2$ ) revela que o grupo pode ser considerado obeso, com controle de peso insatisfatório, uma vez que apenas dezessete pacientes apresentaram IMC igual ou abaixo de  $25\text{kg/m}^2$  e três pacientes, IMC maior que  $40\text{kg/m}^2$ . Os pacientes com IMC igual ou menor que  $25\text{kg/m}^2$  (22%) apresentaram mediana dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário antes do uso de AAS de 163,00 pg/mg creatinina, aqueles com IMC entre 26 e  $30\text{kg/m}^2$  (26%) expressaram mediana de 174,00pg/mg creatinina e os com IMC maior que  $30\text{kg/m}^2$  (52%) tinham mediana de 208,00pg/mg creatinina. Após o uso de AAS, as medianas caíram para 63,00pg/mg creatinina no primeiro grupo (redução de 61%), 51,00pg/mg creatinina no segundo grupo (redução de 71%) e 48,00pg/mg creatinina no terceiro grupo (redução de 77%) (**Tabela 5.4**). Pode-se observar que quanto maior o nível basal do 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, maior a redução após o uso do AAS embora a maior redução alcançada (77%) esteja distante do valor esperado de 95% e caracterize falha no tratamento com AAS. A análise dos pacientes destes três subgrupos formados em função do valor do IMC com relação à diminuição ou não dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário em 50% ou mais mostra que os pacientes com IMC abaixo ou igual a  $25\text{kg/m}^2$  apresentaram comportamento diferente dos pacientes incluídos nos outros dois subgrupos. Entre os pacientes com IMC entre 26 e  $30\text{kg/m}^2$  e entre os com IMC superior a  $30\text{kg/m}^2$  foi encontrado maior número de pacientes com redução igual ou superior a 50% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, sendo que esta diferença foi significativa ( $p=0,010$ ) (**Tabela 5.5**).

Ao ser avaliada a diferença entre as medianas das amostras colhidas nos dois momentos (antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso), foi encontrada diferença significativa entre os subgrupos em que os pacientes foram divididos de acordo com o IMC ( $\leq 25\text{kg/m}^2$ , 26 a  $30\text{kg/m}^2$  e  $> 30\text{kg/m}^2$ ) ( $p=0,028$ ). Os pacientes do subgrupo  $\leq 25\text{kg/m}^2$  apresentaram menor redução que os outros dois subgrupos e o subgrupo 26 a  $30\text{kg/m}^2$  mostrou menor redução do que o subgrupo  $\geq 30\text{kg/m}^2$ .

Quando se investigou a possível associação de variáveis clínicas de pacientes diabéticos com a redução de 50% ou mais dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário



(variável resposta), por meio da aplicação de um modelo de regressão logística, foi observado que apenas o IMC se mostrou associado à redução significativa do marcador acima (**Tabela 5.8**). Pacientes dos subgrupos com IMC entre 26 e 30kg/m<sup>2</sup> e com IMC superior a 30kg/m<sup>2</sup> apresentaram redução significativa dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, fato que não ocorreu com os pacientes com IMC igual ou menor que 25kg/m<sup>2</sup> e nem com qualquer outro subgrupo formado de acordo com todas as outras variáveis estudadas. Esta diferença na redução de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário pode ser devido ao fato de que indivíduos com maior IMC possuem maior número de células adiposas. Estas células podem induzir um estado inflamatório de maior magnitude que apresentaria maior margem de redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário quando iniciada a ação do AAS. No entanto, isto não quer dizer que estes pacientes responderam adequadamente ao uso de AAS, pois para uma proteção eficaz contra eventos cardiovasculares é necessário que os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário tenham uma redução de 90 a 95% (HELGASON et al., 1993; VANE et al., 1998, EIKELBOOM et al., 2008). Conforme pode ser visto na **Tabela 5.4**, os pacientes com IMC entre 26 e 30kg/mm<sup>2</sup> apresentaram uma redução média de 71% e os pacientes com redução IMC superior a 30kg/m<sup>2</sup> apresentaram redução média de 77% que, tecnicamente, indica falha no tratamento com AAS.

Cohen et al. (2008) estudaram o efeito do AAS em pacientes diabéticos e encontraram IMC maior que 30kg/m<sup>2</sup> em 38% dos pacientes. Estes autores, utilizando resultados de função plaquetária obtidos pelo aparelho PFA-100, fizeram análise bivariada e encontraram associação entre obesidade e falha no tratamento com AAS (p=0,006). Existem algumas diferenças entre o estudo de Cohen et al. e este estudo, como a forma de avaliar a resposta ao uso de AAS (teste de função plaquetária x dosagem de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário), o tempo exigido de uso do AAS (24 horas x 15 dias), tamanho da amostra (48 x 81) e ausência de controle da adesão do paciente ao tratamento no estudo de Cohen et al. e monitoramento dos pacientes quanto a esta adesão neste estudo.

Ertugrul et al. (2010), em outro estudo desenvolvido com pacientes diabéticos, encontraram correlação positiva entre IMC e falha no tratamento com AAS (r=0,244; p<0,01), sendo que esta correlação não foi encontrada nos controles que apresentaram falha no tratamento com AAS. No entanto, quando eles realizaram regressão logística multinomial para definir fatores de risco para o *status* de falha no

tratamento com AAS em pacientes diabéticos, a obesidade não se revelou um fator de risco importante. Estes pesquisadores utilizaram teste de agregação plaquetária em sangue total medida por impedância elétrica para avaliar a falha no tratamento com AAS em pacientes que faziam uso de doses variadas de AAS (100 e 300mg) quando comparados a controles que eram pacientes das clínicas de clínica médica, endocrinologia e nefrologia.

Torna-se difícil comparar estudos que avaliam a falha no tratamento com AAS, pois não existe ainda um padrão ouro para esta avaliação. Os testes de agregação plaquetária por turbidimetria apresentam limitações devido à necessidade de obtenção de plasma rico em plaquetas. Os resultados dos testes de agregação plaquetária realizados por agregometria com leitura por impedância elétrica e por PFA-100 apresentaram boa correlação (ERTUGRUL et al., 2010). Não foram encontrados artigos publicados em revistas científicas que relatassem estudos feitos em pacientes diabéticos com o objetivo de avaliar IMC e falha no tratamento ao AAS usando 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário como marcador. Também não foram encontrados estudos da correlação entre teste de agregação plaquetária e dosagem de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário utilizados na avaliação de falha ao tratamento com AAS.

Com relação ao uso de medicamentos, seis pacientes não faziam uso de nenhuma medicação para controle glicêmico, porém o IMC deles estava acima de 30kg/m<sup>2</sup> e foram encontrados níveis de hemoglobina glicada acima de 7,0% para estes pacientes. Isto nos leva a supor que esta situação possa ter sido alterada após a consulta com o médico assistente que se realizou após a entrevista que obteve estes dados. É possível que estes pacientes estivessem em processo de admissão no programa de diabéticos da Santa Casa, encaminhados por profissionais de postos de saúde. Oito pacientes informaram fazer uso apenas de insulina, não souberam explicar o motivo e o perfil deles era variado, sendo que cinco eram do sexo feminino, seis tinham HbA<sub>1c</sub> acima de 7,0%, quatro tinham IMC maior que 30kg/m<sup>2</sup> e dois faziam uso de estatina. O restante dos pacientes fazia uso apenas de hipoglicemiante oral (31%) ou deste medicamento combinado com insulina (52%).

O uso de estatinas foi relatado por 55,6% dos pacientes. Na entrevista com o paciente e análise das prescrições médicas, apenas foi colhida a informação do uso ou não de estatina, não tendo sido registrado o tipo e nem a dosagem do

medicamento. Além da redução nos níveis de lípidos, as estatinas diminuem os níveis de proteína C reativa e de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, independentemente do uso de AAS (ALUSIK et al., 2010). Neste estudo não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes em uso de estatina e os que não a usavam com relação à redução de 50% ou mais nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário ( $p=0,954$ ) (**Tabela 5.5**). Este estudo não foi capaz de captar o efeito da estatina na redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário porque os pacientes em uso deste medicamento colheram as primeiras amostras de urina e sangue já sob o efeito da estatina. Provavelmente este efeito redutor se manifestou antes do paciente ser incluído neste estudo, ou seja, na época em que ele iniciou o uso de estatina. Desta forma, os valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário destes pacientes já estavam reduzidos no momento da coleta da primeira amostra.

As estatinas também possuem potencial antitrombótico, pois reduzem a expressão do fator tecidual em monócitos e em células vasculares e assim reduzem a geração de trombina. Além disso, as estatinas diminuem a liberação de trombosmodulina para o plasma e aumentam a sua disponibilidade na superfície endotelial, o que contribui para melhor desempenho do sistema de anticoagulação natural através da Proteína C (UNDAS et al., 2005). Desta forma, mais da metade dos pacientes estudados dispunham de mais um elemento de proteção contra eventos cardiovasculares, além do AAS.

Com relação ao uso de medicamento inibidor da enzima conversora de angiotensina, dos 68 pacientes (85%) classificados como hipertensos 45 (55,6%) faziam uso deste medicamento. O restante dos pacientes hipertensos fazia uso de outros medicamentos hipotensores como a Losartana.

Não foram realizados testes estatísticos para avaliar a relação entre os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> e o uso de hipoglicemiantes, insulina, estatinas e inibidores da enzima conversora de angiotensina porque as doses dos medicamentos, os princípios ativos e a forma de uso variavam de um paciente para outro. Além disso, seria inviável confirmar a adesão ao tratamento com todos estes medicamentos.

## 6.2 Marcador da produção de Tromboxano A<sub>2</sub> (11-dhTXB<sub>2</sub> urinário)

O 11-dhTXB<sub>2</sub> é o principal metabólito do TXA<sub>2</sub> sintetizado de fontes extra-renais, sendo que as plaquetas são responsáveis pela quase totalidade do TXA<sub>2</sub> produzido pela via da COX-1 (HALUSHKA e HALUSHKA, 2002). Baixas doses de AAS bloqueiam a atividade da COX-1 plaquetária em 95% e não existem evidências de que o efeito antitrombótico do AAS seja relacionado à dose (EIKELBOOM et al., 2002). No entanto, baixas doses de AAS asseguram que o 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário dosado seja de origem extra renal. Isto porque a ciclooxygenase renal, que pode estar envolvida no aumento da produção de tromboxano em condições fisiopatológica, não é afetada por AAS em doses baixas (PATRIGNANI et al., 1982).

Eikelboom et al. (2002) dosaram este metabólito em pacientes inscritos no estudo “*Heart Outcomes Prevention Evaluation*” (HOPE) que faziam uso de AAS, e subdividiram os pacientes em quartís baseados nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário do momento em que o paciente foi incluído no estudo. As análises dos resultados mostraram que os pacientes com níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário no quartil superior tinham risco 1,8 maior de sofrer IAM, AVC ou morte por doença cardiovascular do que aqueles com níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário no quartil inferior.

Embora a desejável redução de 95% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário só tenha sido encontrada em 5% dos pacientes deste estudo, os valores das medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário antes (179,00pg/mg de creatinina) e depois do uso de AAS (51,00pg/mg creatinina) foram estatisticamente diferentes (p=0,00). Não foi observada correlação entre as medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário encontradas nas amostras colhidas antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso deste medicamento (**Tabela 5.16**).

Zisman et al. (2010) estudaram indivíduos saudáveis e pacientes tratados com AAS e verificaram que os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário eram cerca de três vezes menor nos participantes do estudo que tomavam AAS do que os níveis daqueles que não tomavam este medicamento, embora dois pacientes tenham apresentado níveis mais elevados mesmo fazendo uso de AAS. Nossos resultados mostraram que a mediana encontrada para o 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas após o uso de

AAS (51,00pg/mg creatinina) foi mais do que três vezes menor do que o valor encontrado nas amostras colhidas antes do uso de AAS (179,00pg/mg creatinina).

Carroll et al. (2010) dosaram 11-dhTXB<sub>2</sub> na primeira amostra isolada de urina colhida entre duas e oito horas após procedimentos de intervenção cardiológica (cateterismos diversos) de pacientes sensíveis e não-sensíveis ao AAS segundo teste de agregação plaquetária realizados previamente. Os valores encontrados no grupo não sensível (845 ± 614pg/mg de creatinina) foi significativamente maior (p = 0,008) do que os valores encontrados no grupo sensível ao AAS (493 ± 348pg/mg de creatinina). Estes valores, muito mais elevados do que os encontrados neste estudo, já eram esperados, uma vez que esses cateterismos, aos quais os pacientes foram submetidos, por si já promovem ativação plaquetária e geração de tromboxano. Também há de se considerar que a técnica utilizada para as dosagens de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário na pesquisa de Carroll et al. foi o teste *AspirinWorks*, um teste de enzimaensaio desenvolvido para uso em consultório médico e autorizado pelo FDA. Este teste difere daquele empregado neste estudo que foi o *11-dehydroThromboxane B<sub>2</sub>* EIA Cayman, desenvolvido para análises em laboratórios.

Dos pacientes que apresentaram aumento nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, um triplicou os valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e quase dobrou o valor de PCRus, passando da classificação de risco aumentado para estado inflamatório e/ou infeccioso. Outro paciente apresentou aumento de mais de 50% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, porém seu valor basal estava no quartil inferior e seu valor de PCRus não apresentou alteração de classificação. Os outros cinco pacientes com elevação dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário tinham valores basais muito baixos e os aumentos foram discretos (até 20%). O único paciente a não sofrer alteração também tinha nível basal baixo.

Os monócitos/macrófagos são uma rica fonte de TXA<sub>2</sub>, estando logo atrás das plaquetas em potencial capacidade de síntese. Nos macrófagos, a COX-2 induzida é a enzima responsável pela maior parte do metabolismo do ácido araquidônico. Diferentemente das plaquetas, os macrófagos são capazes de sintetizar COX-2 depois da inibição pelo AAS. Além disso, o macrófago inserido na placa aterosclerótica pode contribuir significativamente para a formação de um reservatório de TXA<sub>2</sub> que não é inibido por baixas doses de AAS. No macrófago, a transformação

de AA em prostaglandina  $H_2$  e  $TXA_2$  pode contribuir para a patogênese de síndromes cardiovasculares agudas. Como assinalado por Eikelboom et al. (2002), o  $TXA_2$  sintetizado pelos macrófagos pode ativar as plaquetas e dessa forma contornar a inativação da COX-1 pelo AAS.

A falha no tratamento com AAS identificada pela presença de 11-dh $TXB_2$  urinário pode ser um indicativo de que o paciente continua a ter  $TXA_2$  na circulação sanguínea capaz de ativar plaquetas. Além dos monócitos, neutrófilos e células endoteliais podem produzir  $TXA_2$  independente da ação do AAS (CARROLL et al., 2010). Como o paciente diabético apresenta um estado inflamatório crônico, seus monócitos, neutrófilos e células endoteliais envolvidas na placa aterosclerótica podem produzir  $TXA_2$  suficiente para agregar as plaquetas, mesmo que elas tenham a ciclooxigenase 1 inativada pelo AAS. Esta situação possibilita a formação de um trombo envolvido em evento aterotrombótico durante o uso de AAS pelo paciente.

### **6.3 Marcador de estado inflamatório (PCRus)**

As crescentes evidências do envolvimento de processos inflamatórios na patogênese da aterosclerose tornaram necessária a identificação de um marcador capaz de prever ruptura da placa e os eventos isquêmicos que a sucedem, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (MONTECUCCO e MACH, 2008). A proteína C reativa tem sido considerada como sendo este marcador e seu uso foi recomendado no monitoramento da prevenção primária (DEVARAJ et al., 2009). Para a estratificação do risco foi necessária a implantação de análise laboratorial ultra-sensível capaz de detectar mínimas quantidades de proteína C reativa, tendo sido estabelecido os seguintes pontos: baixo risco: < 1,00mg/L; risco moderado: de 1,00 a 3,00mg/L; risco alto: > 3,00mg/L; processos inflamatórios / infecciosos: > 5,00mg/L (RIDKER, 2004).

A análise dos valores de PCRus dos participantes deste estudo não encontrou diferença significativa entre as medianas de PCRus encontradas antes e aos 15 dias de uso diário de AAS, indicando que este medicamento não foi capaz de alterar seus níveis. Não foi encontrada correlação entre as medianas de PCRus e 11-dh $TXB_2$

urinário encontrados para as amostras colhidas antes e depois do uso de AAS. No entanto, 18,5% dos pacientes aumentaram seu *status* de risco durante os 15 dias do estudo (**Tabela 5.11**), indicando alteração no estado inflamatório independente do uso de AAS. Entre os pacientes com baixo risco no início do estudo (n=13), 69% mantiveram este *status* (n=9) e 8,8% dos pacientes com outros *status* de risco (n=6) passaram a ter baixo risco após o uso de AAS, embora este medicamento não possa ser considerado responsável por esta situação.

A constatação de que um terço dos pacientes estudados possivelmente apresentava processo inflamatório/infeccioso antes e após o uso de AAS (**Tabela 5.10**) é preocupante, pois o estado inflamatório estimula a ação da ciclooxygenase 2 das células endoteliais, com consequente aumento na produção de tromboxano A<sub>2</sub> que pode ativar as plaquetas independentemente da inativação da COX-1 pelo AAS. Estas análises dos valores de PCRus encontrados nas amostras de sangue colhidas nos dois momentos do estudo (antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso) sugerem que além de procurar diminuir a capacidade de agregação plaquetária dos pacientes, é necessário dedicar atenção ao estado inflamatório causado pela atividade das placas ateroscleróticas. No entanto, uma metanálise publicada em outubro de 2009 concluiu que: 1- existem fortes evidências de que a proteína C reativa está associada a eventos cardiovasculares; 2- moderadas e consistentes evidências sugerem que adicionar proteína C reativa aos modelos de predição de risco para pessoas inicialmente com risco intermediário melhora a estratificação do risco e 3- não existe evidência suficiente de que a diminuição dos níveis de proteína C reativa previne a ocorrência de evento cardiovascular (BUCKLEY et al., 2009).

#### **6.4 Marcador de adesão ao tratamento (metabólitos do AAS)**

A presença de metabólitos do AAS foi observada no plasma de quatorze pacientes. Dezessete amostras apresentaram interferentes, sendo que dez amostras haviam sido coletadas antes do uso de AAS e sete após o uso do medicamento. Uma possível causa para a aparição de interferentes durante a análise é a ingestão concomitante de outros fármacos por parte do paciente. Das quatro amostras não

injetadas no aparelho de HPLC, três correspondiam ao primeiro momento de coleta e uma ao segundo.

Cento e vinte e sete amostras não apresentaram pico no cromatograma, ou seja, não apresentavam os metabólitos do AAS. No entanto, isto não pode ser interpretado como falha na adesão ao tratamento, pois considerando que a coleta de sangue dos pacientes foi realizada cerca de vinte horas após a administração do medicamento, a ausência de picos nos cromatogramas pode ser atribuída a dois problemas. O primeiro seria concentrações muito reduzidas dos analitos no plasma dos pacientes, uma vez que de acordo com dados da literatura (THE MERCK INDEX, 2001), a meia-vida de eliminação do ácido salicílico é de duas a três horas, de forma que, após vinte horas, a maior parte do fármaco já teria sido metabolizada. Não foram encontrados dados na literatura sobre a meia-vida de eliminação do ácido salicílico (ácido 2-hidroxihipúrico), entretanto, as concentrações plasmáticas do metabólito provavelmente também estariam reduzidas no momento de coleta. O segundo seria a perda de AS por sublimação durante a etapa de evaporação no preparo das amostras (KEES et al., 1996) além de baixa e/ou variada recuperação durante o procedimento de precipitação de proteínas devido à ligação de proteínas com o AS (MCMAHON e KELLY, 1998).

A presença de metabólitos do AAS em quatorze amostras de plasma colhidas vinte horas após o horário recomendado para a ingestão do AAS, nos remete à idéia de que estes pacientes ingeriram o AAS algumas horas após o horário estipulado pelo médico assistente (após o almoço).

Talvez a amostra mais adequada para esta análise fosse a urina do paciente, onde os metabólitos poderiam ser encontrados cerca de vinte horas após a ingestão do AAS. Esta análise não foi possível por falta de padronização da técnica.

Eikelboom et al. (2002) e Gum et al. (2003) estudaram a falha no tratamento com AAS e usaram confirmação verbal de uso de AAS por parte dos pacientes. No entanto, Schwartz et al. (2008) e Cuisset et al. (2009) estudaram o efeito da não adesão na falha ao tratamento com AAS sendo que Schwartz et al. encontraram 9% de pacientes rotulados como não responsivos ao uso de AAS que, na realidade, não haviam aderido ao tratamento e Cuisset et al. encontraram 10% de pacientes na mesma situação.



O resultado das análises dos metabólitos do AAS não nos permite saber se todos os pacientes fizeram uso adequado do AAS, mas o acompanhamento dos mesmos realizado no intervalo entre as coletas teve o objetivo de não perder o paciente e de conscientizá-lo da necessidade de fazer uso diário do AAS. No dia da primeira coleta de sangue foi confirmada a posse de pelo menos quinze comprimidos de AAS por parte do paciente, foi feito pelo menos um contato telefônico com o paciente no intervalo entre as coletas de sangue e este foi informado em mais de um momento que seria realizado exame de sangue para comprovar que ele havia feito uso do AAS. Estes cuidados permitem inferir que os pacientes que compareceram à segunda coleta haviam aderido corretamente ao tratamento.

## **6.5 Parâmetros bioquímicos, hematológicos e moleculares**

### **6.5.1 Marcador de controle glicêmico (HbA<sub>1c</sub>)**

Dos pacientes estudados, apenas 32% apresentaram controle glicêmico satisfatório, com níveis de HbA<sub>1c</sub> inferiores a 7,0%. Os pacientes que apresentaram níveis entre 7,0 e 9,9% (55%) e os que estavam com de HbA<sub>1c</sub> igual ou maior que 10,0% (13%), além de estarem expostos a maior risco de doença cardiovascular (SINGLA et al., 2009), apresentavam maior risco de não responderem ao tratamento com AAS (ERTUGRUL et al., 2010).

Analisando os valores das medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário obtidas para os três subgrupos formados pelos valores de HbA<sub>1c</sub>, não foi encontrada diferença significativa entre os valores dos três grupos antes ( $p=0,674$ ) e depois do uso de AAS ( $p=0,312$ ). No entanto, o uso de AAS fez diferença nos valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário dos três grupos ( $p=0,00$ ;  $p=0,00$  e  $p=0,02$ ) (**Tabela 5.4**) embora os níveis de redução caracterizem falha no tratamento com AAS.

A análise dos três subgrupos de pacientes formados pelos valores de HbA<sub>1c</sub> (< 7,0%, entre 7,0 e 9,9% e  $\geq 10,0\%$ ) em relação à redução  $\geq 50\%$  ou  $< 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário não mostrou diferença entre os grupos ( $p=0,980$ ) (**Tabela 5.5**).

Cohen et al. (2008) encontraram associação entre falha no tratamento com AAS e HbA<sub>1C</sub> igual ou maior que 8%. Ertugrul et al. encontraram correlação positiva entre falha no tratamento com AAS e níveis de HbA<sub>1C</sub> ( $r=0,297$ ;  $p<0,0001$ ). Estes resultados diferem dos encontrados neste estudo e aqui também se aplicam todas as considerações feitas na secção 6.1 onde se discutiu os resultados encontrados para a variável IMC, que neste estudo apresentou resultados diferentes dos encontrados por estes mesmos autores. Diferenças em métodos analíticos, características e tamanho das amostras bem como nas doses de AAS utilizadas pelos pacientes inviabilizam a comparação entre os estudos, que são aqui citados com o objetivo de informar o que outros grupos de pesquisa têm relatado sobre suas investigações.

### **6.5.2 Marcador de fibrinólise (Dímero-D)**

A análise dos valores de dímero-D dos participantes do estudo mostrou que as medianas encontradas nas amostras de sangue colhidas antes e aos 15 dias de uso de AAS estavam dentro do valor de referência, e que não foi encontrada diferença significativa entre os dois valores ( $p=0,558$ ) (**Tabela 5.14**). Isto mostra que o uso de AAS não interferiu na formação de dímero-D, ou seja, na fibrinólise. Quando se dividiu o grupo de pacientes em subgrupos, de acordo com a percentagem de redução nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, ou seja, redução ou não de 50%, não se observou nenhuma diferença nos valores de dímero-D (**Tabela 5.15**). Esses resultados mostram que não há relação entre os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário alcançados após quinze dias de uso de AAS e os níveis de dímero-D medidos no mesmo momento.

O estudo da correlação entre os níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e dímero-D antes e depois do uso de AAS não apresentou correlação (**Tabela 5.16**), mostrando mais uma vez que o uso de AAS não afetou os níveis de dímero-D e não impactou o estado de hipercoagulabilidade que pode ser encontrado no paciente diabético. Também não foi encontrada correlação entre níveis de dímero-D antes e depois do uso de AAS e HbA<sub>1C</sub> (**Tabela 5.17**), ou seja, o estado de controle glicêmico do

paciente no início do estudo não interferiu nos níveis de dímero-D durante o período em que o paciente fez uso de AAS. Relatos de pesquisa envolvendo níveis de dímero-D e 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário não foram encontrados em publicações científicas.

### **6.5.3 Contagem de plaquetas**

Os resultados encontrados nas contagens das plaquetas dos pacientes confirmam a ausência de plaquetopenia e de plaquetocitose, pois apenas dois pacientes apresentaram valores abaixo do valor de referência (128.000 e 138.000/mm<sup>3</sup>) e apenas um paciente tinha número de plaquetas acima do valor de referência (404.000/mm<sup>3</sup>). Esta situação exclui a possibilidade do efeito do AAS sobre a COX-1 plaquetária ter sido afetado por plaquetopenia ou plaquetocitose. É importante ressaltar que em pacientes com plaquetocitose ou *turn-over* plaquetário aumentado, a dose diária de 100mg pode não ser suficiente para inativar todas as plaquetas (HANKEY e EIKELBOOM, 2006).

A formação de dois subgrupos de pacientes de acordo com a contagem de plaquetas (< 250.000/mm<sup>3</sup> e ≥ 250.000/mm<sup>3</sup>) permitiu verificar que dentro da faixa das contagens de plaquetas encontradas nos pacientes deste estudo (128.000 a 404.000/mm<sup>3</sup>) o número de plaquetas não interfere na distribuição dos pacientes que apresentaram redução ≥ 50% ou < 50% nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário aos 15 dias de uso diário de 100mg de AAS (**Tabela 5.18**).

### **6.5.4 Classificação de grupo sanguíneo**

Os pacientes foram classificados em dois grupos em relação à tipagem sanguínea: “O” e “não-O”. Quando se estudou a distribuição dos pacientes em relação à redução ≥ 50% ou < 50% dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e grupo sanguíneo (**Tabela 5.5**), foi possível verificar que não houve diferença de comportamento entre os grupos, ou seja, o grupo sanguíneo não afetou a redução dos níveis de 11-

dhTXB<sub>2</sub> urinário dos pacientes estudados. A análise dos valores de dímero-D obtidos nas amostras de sangue colhidas antes e depois do uso de AAS para os dois grupos sanguíneos (“O” e “não-O”) (**Tabela 5.19**) mostrou que não houve diferença significativa. Quando foi feito o estudo de correlação entre os níveis de dímero-D obtidos nas amostras colhidas antes e depois do uso de AAS e o grupo sanguíneo do paciente (**Tabela 5.20**), foi observada uma correlação positiva, com ambos os grupos mantendo o comportamento de correlação entre os valores de dímero-D obtidos nas amostras colhidas antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso do medicamento. Isto reflete o comportamento encontrado quando foi estudada a correlação entre os valores de dímero-D das amostras colhidas antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso deste medicamento para os pacientes como um todo ( $p=0,00$ ) (**Tabela 5.16**).

Um estudo de Jick et al. (1969) revelou que pacientes de grupo sanguíneo “O” eram minoria entre pacientes em uso de anticoagulação oral devido à ocorrência prévia de trombose venosa. Morelli et al. (2005), ao estudar o efeito do grupo sanguíneo do paciente no risco de trombose em pacientes participantes do *Leiden Thrombophilia Study* (LETS), verificaram que os portadores dos alelos A e/ou B apresentaram risco duas vezes maior de primeiro evento de trombose venosa profunda e que os genótipos “não – OO” influenciam fortemente o risco de trombose em portadores do fator V de Leiden. Jukic et al. (2009) confirmaram a associação entre genótipos de grupo sanguíneo “não - OO” e aumento no risco de trombose ao estudar pacientes da Croácia. Este estado de hipercoagulabilidade que parece acompanhar os indivíduos do grupo “não-O” pode estar relacionado a níveis aumentados de fator VIII e fator de von Willebrand que são encontrados nestes indivíduos (MORELLI et al., 2005).

Os subgrupos de tipo sanguíneo “O” e “não-O” dos pacientes do nosso estudo não apresentaram diferença nos valores de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário e de dímero-D que pudesse indicar diferença no risco de trombose. Esta discordância com a literatura pode ser devida ao fato de que os estudos citados não se restringiram aos pacientes diabéticos que sabidamente apresentam comportamento metabólico e hemostático diferentes do restante da população. É possível que a influência de processos inflamatórios já existentes nos pacientes em decorrência da diabetes prevaleça sobre o possível efeito dos grupos sanguíneos “não O” no perfil hemostático.

### **6.5.5 Determinação do colesterol total e fracionado**

Análise da **Tabela 5.21**, que apresenta o perfil lipídico dos pacientes estudados, revela que as medianas de colesterol total, HDL e LDL bem como de triglicérides estão dentro ou no limite dos valores de referência. Considerando que 55,6% dos pacientes fazem uso de estatinas, era de se esperar que o perfil lipídico dos pacientes fosse satisfatório. Na **Tabela 5.4** estão apresentadas as medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário encontradas para subgrupos formados por pacientes que apresentaram valores de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicérides dentro e acima do valor desejável. Não houve diferença significativa entre os subgrupos em relação aos valores basais e depois do uso de AAS. No entanto, todos os subgrupos apresentaram redução significativa ainda que não tenha alcançado 95%.

Os pacientes foram divididos em subgrupos conforme seus valores de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicérides estivessem dentro ou acima do valor desejável e na **Tabela 5.5** pode ser verificado que estes subgrupos não apresentaram diferenças quanto à redução  $\geq 50\%$  ou  $< 50\%$  dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário. Provavelmente isto se deve ao uso de estatina por parte dos pacientes cujos níveis de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicérides não eram os desejáveis.

Para que o AAS exerça seu efeito, acetilando e inativando a COX-1 é muito importante que o paciente mantenha seu perfil lipídico dentro dos parâmetros desejáveis, pois vários autores já relataram a interferência da hipercolesterolemia na ação do AAS. Szczeklik et al. (1996) explicaram a falha na ação do AAS na hipercolesterolemia pela menor acessibilidade do AAS para acetilação das proteínas da membrana plaquetária com estrutura lípide-proteína alterada. Davi e Patrono (2007) descreveram um mecanismo insensível ao AAS pelo qual a peroxidação lipídica, fortemente presente na hipercolesterolemia, é capaz de promover a ativação plaquetária. Em 2004, Watala et al. demonstraram associação entre diminuição da sensibilidade das plaquetas ao AAS e aumento da concentração de colesterol total em pacientes diabéticos.

### **6.5.6 Estudo do polimorfismo do gene da GPIIIa (PI<sup>A</sup>)**

O estudo do polimorfismo do gene da GPIIIa (PI<sup>A</sup>) mostrou que 23,46% dos pacientes estudados apresentavam o genótipo PI<sup>A1A2</sup>, enquanto que PI<sup>A2A2</sup> foi encontrado em 2,47% dos pacientes (**Tabela 5.22**).

A análise da distribuição dos pacientes em subgrupos conforme a ausência ou presença do alelo PI<sup>A2</sup>, em relação à redução  $\geq 50\%$  e  $< 50\%$  nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário, não mostrou diferença entre os grupos ( $p=0,411$  e  $p=0,486$ ) (**Tabela 5.5**).

Neste estudo, não foi observada diferença significativa entre as medianas de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário dos pacientes PI<sup>A1A1</sup> e daqueles com ao menos um alelo PI<sup>A2</sup> nas amostras colhidas antes do uso de AAS (medianas 179,50 e 156,00pg/mg creatinina) ( $p=0,121$ ) (**Tabela 5.4**). A mediana de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário das amostras colhidas após o uso de 100mg de AAS por 15 dias dos pacientes PI<sup>A1A1</sup> (55,50pg/mg creatinina) foi significativamente diferente da mediana encontrada para as amostras dos pacientes com ao menos um alelo PI<sup>A2</sup> colhidas após 15 dias de uso de AAS (36,00pg/mg creatinina) ( $p=0,034$ ). No entanto, quando avaliada a mediana das diferenças entre as amostras colhidas nos dois momentos (antes do uso de AAS e aos 15 dias de uso) não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes PI<sup>A1A1</sup> e aqueles com pelo menos um alelo PI<sup>A2</sup> (coluna 6 da **Tabela 5.4**). A análise dos dados encontrados nesta pesquisa mostra que, no grupo de pacientes estudados, o polimorfismo da GPIIIa não está associado à redução nos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário pelo uso diário de 100mg de AAS.

Pamukcu et al. (2005) estudaram o polimorfismo PI<sup>A</sup> da GPIIIa em pacientes com implante de *stent* intracoronariano, sendo que 43 não responderam ao tratamento com AAS e 51 responderam, de acordo com testes de função plaquetária realizados com o aparelho PFA-100. Eles encontraram o alelo PI<sup>A1A1</sup> em 83,7% dos pacientes que não responderam ao AAS e em 72,5% dos pacientes que responderam ao AAS. O alelo PI<sup>A1A2</sup> foi encontrado em 16,2% dos pacientes que não responderam ao AAS e em 27,5% dos pacientes que responderam ao AAS. Eles não encontraram nenhum paciente com o alelo PI<sup>A2A2</sup>. A análise estatística destes dados mostrou não

haver relação significativa entre polimorfismo  $PI^A$  e falha no tratamento com AAS ( $p=0,195$ ).

Macchi et al. (2003) relataram que plaquetas de indivíduos com alelo  $PI^{A1A1}$  parecem ser menos sensíveis à ação inibitória do AAS em baixas doses do que aquelas que apresentam pelo menos um alelo  $P^{A2}$ . Eles estudaram 98 pacientes em uso de 160mg de AAS por um mês e avaliaram o efeito do AAS pelo teste de função plaquetária realizado no aparelho PFA-100. Dos 29 pacientes que não responderam ao uso do AAS, 86,2% eram  $PI^{A1A1}$  e 13,8% tinham ao menos um alelo  $PI^{A2}$  ( $p=0,01$ ). Estudo de regressão logística mostrou que o polimorfismo  $PI^{A1A2}$  do gene plaquetário era fator preditivo independente de falha no tratamento com AAS identificada por teste de função plaquetária realizado em PFA-100. O OR de não responder ao tratamento com AAS foi 4,4 vezes maior em pacientes  $PI^{A1A1}$  do que em pacientes com pelo menos um alelo  $PI^{A2}$ .

Outros pesquisadores (COOKE et al., 1998 e 2006; FENG et al., 1999; MICHELSON et al., 2000; UNDAS et al., 2001) estudaram o efeito da presença do alelo  $PI^{A2}$  na resposta ao tratamento com AAS e clopidogrel, a sensibilidade das plaquetas com este polimorfismo ao ADP e a associação do alelo  $PI^{A2}$  com aumento na geração de trombina. Todos estes cientistas concluíram que a presença de do alelo  $PI^{A2}$  implica em maior risco de evento trombótico. É possível que este aumento no risco não esteja relacionado apenas com a ação do  $TXA_2$ , podendo envolver ação do ADP e da trombina, de forma que o uso de AAS talvez não proteja completamente os pacientes portadores deste polimorfismo.

#### **6.5.7 Estudo do polimorfismo do gene da COX-1**

Entre os 81 pacientes estudados, 12,35% eram heterozigotos para o polimorfismo C50T e 7,40% eram homozigotos (**Tabela 5.23**). Pettinella et al. (2009) genotiparam 148 indivíduos caucasianos e verificaram que 10 (6,7%) eram heterozigotos para o polimorfismo C50T e apenas 1 (0,67%) era homozigoto. Clappers et al. (2008) estudaram 496 pacientes e encontraram 62 pacientes heterozigotos (12,5%) e 4 homozigotos (0,8%).

Neste estudo foi verificado que a presença do polimorfismo C50T da COX-1 não afetou a redução dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário (**Tabela 5.4**), mesmo resultado encontrado por Pettinella et al. (2009) ao estudar 148 indivíduos saudáveis entre os quais 30 fizeram uso de 100mg de AAS diariamente por quatro semanas. Clappers et al. (2008) estudaram 496 pacientes atendidos na unidade coronariana de um hospital e que faziam uso de 80mg de AAS diariamente e não encontraram associação entre o haplótipo -842G/C50T e maior risco de evento aterotrombótico. No entanto, Maree et al. (2005, b) estudaram 144 pacientes com doença cardiovascular e observaram que os pacientes com os alelos -842G/50T apresentavam menor sensibilidade ao AAS nos testes de agregação plaquetária. Maree et al. admitiram que encontraram poucos pacientes com agregação plaquetária aumentada e que portanto seria necessário fazer um estudo com um número maior de pacientes em uso de AAS e que apresentassem agregação plaquetária significativa. Neste estudo foi observada uma situação inversa, onde a grande porcentagem de pacientes que não responderam ao uso de AAS (86%) pode ter dificultado a avaliação da significância de muitas variáveis estudadas, entre elas o polimorfismo da COX-1.

## 6.7 Considerações finais

Nossos resultados estão em concordância com a literatura ao sugerir que o tratamento dos pacientes diabéticos com AAS, na dosagem de 100mg diários, durante 15 dias, para prevenção primária não seja eficiente a ponto de suprimir a produção de TXA<sub>2</sub> que pode ativar as plaquetas e participar da formação de trombo com potencial para causar doença cardiovascular ou AVC.

Pode ser que o diabetes, por si, já seja um causador de falha no tratamento com AAS. Esta situação pode ser desencadeada por diversos mecanismos agindo em conjunto, como a hiperatividade plaquetária, aumento dos níveis circulantes de moléculas de adesão derivadas do endotélio indicativas de estado inflamatório e a excessiva resposta inflamatória presente nos pacientes diabéticos, que pode



desencadear a produção de COX-2 em monócitos e macrófagos e estimular a produção de TXA<sub>2</sub> independente de COX-1.

Embora se saiba que as plaquetas dos pacientes diabéticos têm a função alterada, ainda não está claro qual o impacto disso na dose de AAS necessária para o efeito cardioprotetor no paciente diabético. Existem muitas vias alternativas para a ativação e agregação plaquetária (ADP, trombina, epinefrina, fator de von Willebrand) que são independentes de TXA<sub>2</sub> e por isto não são sensíveis aos efeitos do AAS. Devido a esta possibilidade de persistência do risco de formação de trombo com as plaquetas indevidamente ativadas, torna-se necessário o monitoramento do pacientes diabéticos quanto a este aspecto.

Exames laboratoriais permitem o controle do tratamento para manter os níveis de glicose e colesterol sanguíneo dentro do valor clinicamente recomendado. No entanto, a eficiência do tratamento com AAS como antiagregante antiplaquetário ainda não pode ser monitorada satisfatoriamente do ponto de vista laboratorial. Testes de agregação plaquetária e de citometria de fluxo são impraticáveis na rotina laboratorial, embora a entrada no mercado de aparelhos como o PFA-100 tenha como objetivo contornar esta dificuldade. Os dados obtidos neste estudo sugerem que a análise dos níveis de 11-dhTXB<sub>2</sub> urinário realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) seja uma forma viável de incluir um monitoramento do uso de AAS na rotina laboratorial. Esta análise reflete melhor a ativação plaquetária *in vivo* e ensaios imunoenzimáticos já fazem parte do dia a dia do laboratório. Mas, torna-se necessário o estabelecimento de valores de referência, para que os resultados obtidos nos exames laboratoriais sejam capazes de fornecer ao médico que acompanha o paciente uma avaliação clara e inequívoca do *status* de proteção obtido com o uso de AAS na prevenção de eventos aterotrombóticos.

### **6.8 Perspectivas para a prevenção de evento aterotrombótico em pacientes diabéticos**

Os estudos recentes sugerem que, na prevenção primária, alguns pacientes diabéticos não se beneficiam do efeito do AAS como inibidor da síntese de TXA<sub>2</sub>

(metanálises de Zhang et al., 2010 e de Baigent, 2009 e os artigos citados no **Quadro 1**). Esta situação motivou a *American Diabetes Association* e a *American Heart Association* a alertar os médicos sobre a necessidade de análise criteriosa das evidências dos benefícios e riscos do uso de AAS e a divulgar orientações para o uso de AAS na prevenção primária de eventos cardiovasculares em pacientes diabéticos. Para a prevenção secundária, parece não haver dúvidas quanto à indicação do AAS para os pacientes que responderem de forma adequada a este medicamento.

Atualmente, a decisão de como fazer a prevenção primária de evento aterotrombótico em pacientes diabéticos exige análise cuidadosa do risco global de cada paciente, individualizando as condutas e avaliando o risco/benefício do uso de AAS. Abordagens alternativas incluem mudanças no estilo de vida que possam diminuir o risco cardiovascular como evitar o tabagismo, usar estatina para diminuir o nível de colesterol, manter a pressão sistólica abaixo de 13mmHg, reduzir excesso de peso e, principalmente, manter um bom controle da glicemia.

Para aqueles pacientes que necessitam de fato de um antiagregante plaquetário e que não respondem bem ao AAS, existe a alternativa de usar outras drogas como o clopidogrel que age sobre os receptores de ADP, mas que, infelizmente, também está sendo objeto de estudos clínicos devido a relatos de falha no tratamento com este medicamento. A indústria farmacêutica trabalha incessantemente no desenvolvimento de novas drogas antiplaquetárias que sejam mais eficientes e com menos efeitos colaterais, no entanto, muitas vezes estes novos medicamentos não estão acessíveis aos pacientes da rede pública de saúde do Brasil.

Diversos estudos ainda estão sendo realizados em outros países, tendo como objetivo esclarecer melhor a questão da prevenção primária e secundária de eventos aterotrombóticos em pacientes com diabetes mellitus 2. Quando os resultados destes estudos forem publicados, talvez esta questão seja esclarecida de forma satisfatória.

## 7 CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos no presente estudo nos permite as seguintes conclusões:

1. Os pacientes com diabetes mellitus tipo 2 responderam de forma variada e insatisfatória ao uso de AAS, uma vez que a maioria dos pacientes não apresentou a redução mínima desejável de 90% nos níveis de 11-dihidro tromboxano B<sub>2</sub> urinário, sugerindo que talvez, na prevenção primária, pacientes diabéticos não se beneficiam adequadamente do efeito do AAS como inibidor da síntese de tromboxano A<sub>2</sub>.
2. As diversas variáveis clínicas e laboratoriais estudadas não estão associadas à redução igual ou maior que 50% nos níveis de 11- dihidro tromboxano B<sub>2</sub> urinário, exceto o “Índice de Massa Corporal” (IMC). Embora a redução observada em pacientes com IMC igual ou superior a 26kg/m<sup>2</sup> tenha sido maior que nos outros grupos, esta foi inferior à redução mínima desejável de 90%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, S. S. et al. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 2878-2887, mar. 2009.
- AJJAN, R. et al. Aspirin resistance and diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 51, n. 3, p. 385-390, mar. 2008.
- ALMENOFF, P. L. et al. Pulmonary function survey in spinal cord injury: influences of smoking and level and completeness of injury. **Lung**, v. 173, n. 5, p. 297-306, 1995.
- ALUSIK, S. et al. The inhibitory effect of statins on urinary 11-dehydrothromboxane levels. **Int. Angiol.**, v. 29, n. 3, p. 255-259, jun. 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, suppl.1, p. S62-S69, jan. 2010.a.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Executive summary: standards of medical care in diabetes – 2010. **Diabetes care**, v. 33, suppl. 1, p. S4-S10, jan. 2010. b.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v.29, suppl. 1, p. S43 - S48. 2006.
- ANTITHROMBOTIC TRIALISTS' COLLABORATION. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. **BMJ**. v.324, n. 7329, p. 71-86, 2002
- ANVISA: [www4.anvisa.gov.br/BulárioEletronico/default.asp?txtPrincipioAtivo](http://www4.anvisa.gov.br/BulárioEletronico/default.asp?txtPrincipioAtivo)
- BAIGENT, C. et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. **Lancet**, v. 373, n. 9678, p. 1849-1860, maio 2009.
- BAKHLE, Y. S. Structure of COX-1 and COX-2 enzymes and their interaction with inhibitors. **Drugs Today (Barc. )**, v. 35, n. 4-5, p. 237-250, abr. 1999.
- BELCH, J. et al. The prevention of progression of arterial disease and diabetes (POPADAD) trial: factorial randomised placebo controlled trial of aspirin and antioxidants in patients with diabetes and asymptomatic peripheral arterial disease. **BMJ**, v. 337, p. 840, 2008.
- BICK R. L.; MURANO, G. Physiology of hemostasis. In:\_\_\_\_\_. **Disorders of Thrombosis & Hemostasis: clinical and laboratory practice**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. cap.1, p. 1-29.

BUCKLEY, D.I. et al. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Forces. **Ann. Intern. Med.**, v. 151, n. 7, p. 483-496, out. 2009.

BUSE, J. B. et al. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 162-172, jan. 2007.

CAMARGO, E. G. et al. Aspirina em baixa dosagem em pacientes com diabetes mellitus: riscos e benefícios em relação às complicações macro e microvasculares. **Arq. Bras. Endoc. Metab.**, v. 51, n. 3, p. 457-465, 2007.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J. Bras. Pat. Med. Lab.** v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CARROLL, R.C.; WORTHINGTON, R.E.; CRAFT, R.M. et al. Post interventional cardiology urinary thromboxane correlates with PlateletMapping® detected aspirin resistance. **Thromb. Res.**, v. 125, n.4, p. 118-122, abril 2010.

CATELLA, F.; FITZGERALD, G. A. Paired analysis of urinary thromboxane B2 metabolites in humans. **Thromb. Res.**, v. 47, n. 6, p. 647-656, set. 1987.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, out. 2002.

CICMIL, M. et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets. **Blood**, v. 99, n. 1, p. 137-144, jan. 2002.

CLAPPERS, N. et al. The C50T polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene and the risk of thrombotic events during low-dose therapy with acetyl salicylic acid. **Thromb. Haemost.**, v. 100, n. 1, p. 70-75, jul. 2008.

COHEN, H. W. et al. Aspirin resistance associated with HbA1c and obesity in diabetic patients. **J. Diabetes Complications**, v. 22, n. 3, p. 224-228, maio 2008.

COOK, J. A. Eicosanoids. **Crit Care Med.**, v. 33, supl.12, p. S488-S491, dez. 2005.

COOKE, G.E. et al.  $PI^{A2}$  Polymorphism and efficacy of aspirin. **Lancet**, v. 351, p. 1253, 1998.

COOKE, G.E. et al. Effect of platelet antigen polymorphism on platelet inhibition by aspirin, clopidogrel, or their combination. **JACC**, v. 47, n. 3, p.541-546, 2006.

COX, D. et al. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. **Stroke**, v. 37, n. 8, p. 2153-2158, ago. 2006.

CUISSET, T. et al. Aspirin noncompliance is the major cause of "aspirin resistance" in patients undergoing coronary stenting. **Am. Heart J.**, v. 157, n. 5, p. 889-893, maio 2009.

DAVI, G.; PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 24, p. 2482-2494, dez. 2007.

DAVIE, E. W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 51, p. 50819-50832, dez. 2003.

DENIS, M. M. et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. **Cell**, v. 122, n. 3, p. 379-391, ago. 2005.

DEVARAJ,S.; SINGH, U.; JIALAL, I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. **Clin. Chem.**, v.55, n.2, p. 229-238, 2009.

DICHIARA, J. et al. The effect of aspirin dosing on platelet function in diabetic and nondiabetic patients: an analysis from the aspirin-induced platelet effect (ASPECT) study. **Diabetes**, v. 56, n. 12, p. 3014-3019, dez. 2007.

DIMINNO, G. et al. Trial of repeated low-dose aspirin in diabetic angiopathy. **Blood**, v. 68, n. 4, p. 886-891, out. 1986.

EIKELBOOM, J. W. et al. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. **Circulation**, v. 105, n. 14, p. 1650-1655, abr. 2002.

EIKELBOOM, J. W. et al. Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid: determinants and effect on cardiovascular risk. **Circulation**, v. 118, n. 17, p. 1705-1712, out. 2008.

ERTUGRUL, D. T. et al. Aspirin resistance is associated with glycemic control, the dose of aspirin, and obesity in type 2 diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 95, n. 6, p. 2897-2901, jun. 2010.

FATEH-MOGHADAM, S. et al. Prevalence of aspirin resistance in patients with type 2 diabetes. **Acta Diabetol.**, v. 42, n. 2, p. 99-103, jun. 2005.

FENG, D. et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GP IIIa PIA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 1142-1147, 1999.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina (RP)**, v. 34, p. 229-237, Jul.-Dez. 2001.

Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, n. 3, p. 129-135, jul. 1989.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanisms of thrombus formation. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 9, p. 938-949, ago. 2008.

GAWAZ, M. et al. Platelets in inflammation and atherogenesis. **J. Clin. Invest**, v. 115, n. 12, p. 3378-3384, dez. 2005.

GENGO, F. M. et al. Prevalence of platelet nonresponsiveness to aspirin in patients treated for secondary stroke prophylaxis and in patients with recurrent ischemic events. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 48, n. 3, p. 335-343, mar. 2008.

GONZALEZ-CONEJERO, R. et al. Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? **Stroke**, v. 36, n. 2, p. 276-280, fev. 2005.

GROTEMEYER, K. H. et al. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. **Thromb. Res.**, v. 71, n. 5, p. 397-403, set. 1993.

GRUNDMANN, K. et al. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. **J. Neurol.**, v. 250, n. 1, p. 63-66, jan. 2003.

GUM, P. A. et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 41, n. 6, p. 961-965, mar. 2003.

GUM, P. A. et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 88, n. 3, p. 230-235, ago. 2001.

HALUSHKA, M. K. et al. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 73, n. 1, p. 122-130, jan. 2003.

HALUSHKA, M.K.; HALUSHKA, P.V. Why are some individuals resistant to the cardioprotective effects of aspirin?: Could it be thromboxane A<sub>2</sub>? **Circulation**, v. 105, p. 1620-1622, 2002.

HANKEY, G. J.; EIKELBOOM, J. W. Aspirin resistance. **Lancet**, v. 367, n. 9510, p. 606-617, fev. 2006.

HARDING, S. A. et al. Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. **Circulation**, v. 109, n. 16, p. 1926-1929, abr. 2004.

HELGASON, C. M. et al. Aspirin response and failure in cerebral infarction. **Stroke**, v. 24, n. 3, p. 345-350, mar. 1993.

HEMLER, M.; LANDS, W. E. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 251, n. 18, p. 5575-5579, set. 1976.

HERSH, E. V. et al. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 21, n. 8, p. 1217-1226, ago. 2005.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 21, n. 1, p. 1-11, fev. 2007.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **J. Thromb. Thrombolysis.**, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, ago. 2003.

HUBER, K. et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease. Status report 2001. **Thromb. Res.**, v. 103, supl.1, p. S7-19, set. 2001.

HUNG, J. et al. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. **Circulation**, v. 92, n. 9, p. 2432-2436, nov. 1995.

JENKINS, P.V., O'DONNELL, J.S. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? **Transfusion**, v. 46:p. 1836-1844, 2006.

JENNINGS, L. K. Role of platelets in atherothrombosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 103, n. 3, supl. p. 4A-10A, fev. 2009.

JICK, H. et al. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. A cooperative study. **Lancet**, v. 1, n. 7594, p. 539-542, mar. 1969.

JONES, K. L. et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1456-1463, set. 2001.

JUKIC, I. et al. ABO blood groups and genetic risk factors for thrombosis in Croatian population. **Croat. Med. J.**, v. 50, n. 6, p. 550-558, dez. 2009.

KANNEL, W. B.; MCGEE, D. L. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. **Diabetes Care**, v. 2, n. 2, p. 120-126, mar. 1979.

KEES, F. et al. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B Biomed. Appl.**, v. 677, n. 1, p. 172-177, fev. 1996.



KRIVOSIKOVA, Z. et al. A highly sensitive HPLC method for the simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic and salicyluric acids in biologic fluids: pharmacokinetic, metabolic and monitoring implications. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 18, n. 8, p. 527-532, out. 1996.

KUNICKI, T. J.; NEWMAN, P. J. The molecular immunology of human platelet proteins. **Blood**, v. 80, n. 6, p. 1386-1404, set. 1992.

LEMAITRE, R. N. et al. Variation in eicosanoid genes, non-fatal myocardial infarction and ischemic stroke. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. e58-e63, jun. 2009.

MACCHI, L. et al. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PIA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalph) polymorphisms. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 42, n. 6, p. 1115-1119, set. 2003.

MANN, K. G. et al. Blood coagulation dynamics in haemostasis. **Hamostaseologie.**, v. 29, n. 1, p. 7-16, jan. 2009.

MAREE, A. O. et al. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 46, n. 7, p. 1258-1263, out. 2005. a.

MAREE, A.O. et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, p. 2340-2345, 2005. b.

MASON, P. J. et al. Aspirin resistance and atherothrombotic disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 46, n. 6, p. 986-993, set. 2005.

MCCMAHON, G. P.; KELLY, M. T. Determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by column-switching liquid chromatography using on-line solid-phase extraction. **Anal. Chem.**, v. 70, n. 2, p. 409-414, jan. 1998.

MEADE, T. W.; BRENNAN, P. J. Determination of who may derive most benefit from aspirin in primary prevention: subgroup results from a randomised controlled trial. **BMJ**, v. 321, n. 7252, p. 13-17, jul. 2000.

MICHELSON, A. D. et al. Current options in platelet function testing. **Am. J. Cardiol.**, v. 98, n. 10A, p. 4N-10N, nov. 2006.

MICHELSON, A. D. et al. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 6, p. 1309-1311, jun. 2005.

MICHELSON, A. D. How platelets work: platelet function and dysfunction. **J. Thromb. Thrombolysis.**, v. 16, n. 1-2, p. 7-12, ago. 2003.

MICHELSON, A. D. et al. Platelet GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. **Circulation**, v. 101, n. 9, p. 1013-1018, mar. 2000.

MONTECUCCO, F. and MACH, F. New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor. **Clin. Interv. Aging.**, v. 3, n. 2, p. 341-349, 2008.

MOREL, O. et al. Diabetes and the platelet: toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 2, p. 367-376, out. 2010.

MORELLI, V. M. et al. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 1, p. 183-185, jan. 2005.

MOUSSAVI, N. et al. Lack of concordance between plasma markers of cardiovascular risk and intima-media thickness in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Obes. Metab**, v. 6, n. 1, p. 69-77, jan. 2004.

NATARAJAN, A. et al. Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: role of antiplatelet agents. **Diab. Vasc. Dis. Res.**, v. 5, n. 2, p. 138-144, jun. 2008.

NETTO, A.P. et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA<sub>1C</sub>) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 1, p. 31-48, fev. 2009.

NEWMAN, P. J. et al. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. **J. Clin. Invest**, v. 83, n. 5, p. 1778-1781, maio 1989.

OGAWA, H. et al. Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 300, n. 18, p. 2134-2141, nov. 2008.

ONG, G. et al. Aspirin is associated with reduced cardiovascular and all-cause mortality in type 2 diabetes in a primary prevention setting: the Fremantle Diabetes study. **Diabetes Care**, v. 33, n. 2, p. 317-321, fev. 2010.

PAIVA, S.G. et al. Polymorphisms in exons 6 and 7 of the ABO locus and their association with venous thrombosis in young Brazilian patients. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, v. 20, n. 2, p. 122-128, mar. 2009.

PAMUKCU, B. et al. The role of platelet glycoprotein IIIa polymorphism in the high prevalence of in vitro aspirin resistance in patients with intracoronary stent restenosis. **Am. Heart J.**, v. 149, n. 4, p. 675-680, abr. 2005.

PATEL, D. K. et al. Metabolism of aspirin after therapeutic and toxic doses. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 9, n. 3, p. 131-136, maio 1990.

PATRIGNANI, P.; FILABOZZI, P.; PATRONO, C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. **J. Clin. Invest.**, v. 69, p. 1366-1372, 1982.

PATRONO, C. et al. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. **Chest**, v. 126, n. 3, suppl. p. 234-264, set. 2004.

PERNEBY, C. et al. Optimization of an enzyme immunoassay for 11-dehydrothromboxane B(2) in urine: comparison with GC-MS. **Thromb. Res.**, v. 96, n. 6, p. 427-436, dez. 1999.

PETTINELLA, C. et al. Cyclooxygenase-1 haplotype C50T/A-842G does not affect platelet response to aspirin. **Thromb. Haemost.**, v. 101, n. 4, p. 687-690, abr. 2009.

PIGNONE, M. et al. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events in people with diabetes: a position statement of the American Diabetes Association, a scientific statement of the American Heart Association, and an expert consensus document of the American College of Cardiology Foundation. **Diabetes Care**, v. 33, n. 6, p. 1395-1402, jun. 2010.

RIDKER, P. M. et al. A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 13, p. 1293-1304, mar. 2005.

RIDKER, P.M. Inflammation in atherothrombosis; how to use high-sensitivity C-reactive protein (hcCRP) in clinical practice. **Am. Heart Hosp. J.**, v. 2, p. 4-9, 2004.

SACCO, R. L. et al. Aspirin and extended-release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 12, p. 1238-1251, set. 2008.

SACCO, M. et al. Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. **Diabetes Care**, v. 26, n. 12, p. 3264-3272, dez. 2003.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, dez. 2001.

SANTILLI, F. et al. Thromboxane-dependent CD40 ligand release in type 2 diabetes mellitus. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 47, n. 2, p. 391-397, jan. 2006.

SCHWARTZ, K. A. et al. Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. **Am. J. Cardiol.**, v. 95, n. 8, p. 973-975, abr. 2005.

SCHWARTZ, K. A. et al. Non-compliance is the predominant cause of aspirin resistance in chronic coronary arterial disease patients. **J. Transl. Med.**, v. 6, p. 46, ago. 2008.

SILVERMAN, Lawrence M.; CHRISTENSON, Robert H. Aminoácidos e Proteínas. In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R. **Tietz fundamentos de química clínica**. 4.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1996. cap.18, p. 268-269.

SINGLA, A. et al. The relation between platelet reactivity and glycemic control in diabetic patients with cardiovascular disease on maintenance aspirin and clopidogrel therapy. **Am. Heart J.**, v. 158, n. 5, p. 784-786, nov. 2009.

SMITH, J. B.; WILLIS, A. L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. **Nat. New Biol.**, v. 231, n. 25, p. 235-237, jun. 1971.

SOUSA, N. C. et al. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. **Haematologica**, v. 92, n. 2, p. 236-239, fev. 2007.

STEINHUBL, S. R. Platelets as mediators of inflammation. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 21, n. 1, p. 115-121, fev. 2007.

STRATMANN, B.; TSCHOEPE, D. Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes. **Diab. Vasc. Dis. Res.**, v. 2, n. 1, p. 16-23, fev. 2005.

SZCZEKLIK, A. et al. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 16, n. 8, p. 948-954, ago. 1996.

TANAKA, K. A. et al. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. **Anesth. Analg.**, v. 108, n. 5, p. 1433-1446, maio 2009.

THE MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13. ED. RAHWAY: MERCK CO., 2001. 1818 P. p.361-362

UNDAS, A. et al. Statins and blood coagulation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 2, p. 287-294, fev. 2005.

UNDAS, A. et al. PI(A2) polymorphism of beta(3) integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury. **Circulation**, v. 104, n. 22, p. 2666-2672, nov. 2001.

UNDAS, A. et al. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism, aspirin, and thrombin generation. **Lancet**, v. 353, n. 9157, p. 982-983, mar. 1999.

VAN OIJEN, M. G. et al. Effect of a specific cyclooxygenase-gene polymorphism (A-842G/C50T) on the occurrence of peptic ulcer hemorrhage. **Dig. Dis. Sci.**, v. 51, n. 12, p. 2348-2352, dez. 2006.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thromb. Res.**, v. 110, n. 5-6, p. 255-258, jun. 2003.

VANE, J. R. et al. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 38, p. 97-120, 1998.

WAKABAYASHI, I.; MASUDA, H. Association of D-dimer with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. **J. Thromb. Thrombolysis.**, v. 27, n. 1, p. 29-35, jan. 2009.

WATALA, C. et al. Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. **J. Mol. Med.**, v. 83, n. 2, p. 148-158, fev. 2005.

WATALA, C. et al. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)-its relation to metabolic control. **Thromb. Res.**, v. 113, n. 2, p. 101-113, 2004.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, maio 2004.

XIAO, Q. et al. Plasminogen deficiency accelerates vessel wall disease in mice predisposed to atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 19, p. 10335-10340, set. 1997.

XIE, W. L. et al. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, abr. 1991.

YU, G. et al. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. **Blood**, v. 105, n. 9, p. 3545-3551, maio 2005.

ZHANG, C. et al. Aspirin for primary prevention of cardiovascular events in patients with diabetes: A meta-analysis. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 87, n. 2, p. 211-218, fev. 2010.

ZISMAN, E. et al. Platelet function recovery after cessation of aspirin: preliminary study of volunteers and surgical patients. **Eur. J. Anaesthesiol.**, v. 27, n. 7, p. 617-623, jul 2010.

ZYTKIEWICZ, M. et al. Resistance to acetylsalicylic acid in patients after ischemic stroke. **Pol. Arch. Med. Wewn.**, v. 118, n. 12, p. 727-733, dez. 2008.

**ANEXO 1 - Parecer COEP-UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


**Parecer nº. ETIC 434 /07**

**Interessado(a): Profa. Maria das Graças Carvalho**  
**Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**  
**Faculdade de Farmácia/UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de setembro de 2007, o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da ação anti-agregante do ácido acetilsalicílico em pacientes em uso deste medicamento" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

## ANEXO 2 - Parecer CEP Santa Casa



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**Registro CEP:** 022/2006 (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto).

**Título:** "Estudo da Ação Anti-Agregante do Ácido Acetil Salicílico em Pacientes em uso deste Medicamento".

**Pesquisadora Responsável:** Dra. Ana Paula Sales Moura Fernandes

**Colaboradores:** Lillian Harboe Gonçalves, Maria das Graças Carvalho, Francisco das Chagas Lima e Silva, Maria Elisabeth Rennó de Castro Santos e Michelle Aparecida Borges.

**Instituições:** Faculdade de Farmácia/UFMG - Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

**Objetivo:**

O presente projeto tem como objetivo geral determinar a frequência de resistência ao uso de AAS em pacientes que utilizam esta medicação bem como investigar os fatores em potencial que contribuem para esta resistência.

**Desenho e metodologia:**

Será realizado um estudo observacional, analítico de uma amostra intencional de pacientes de ambos os sexos e de idade variada, numa amostra da ordem de 300 a 400 indivíduos.

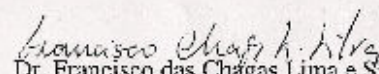
**Comentários:**

O projeto está bem fundamentado do ponto de vista teórico. A metodologia está adequada. Os critérios de inclusão e exclusão estão bem definidos. O planejamento está coerente com os objetivos propostos. A avaliação de riscos e benefícios justifica a execução do projeto e o torna relevante do ponto de vista médico e científico. Do ponto de vista ético, o projeto atende as determinações da CONEP.

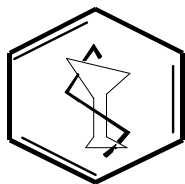
**Parecer**

Diante do exposto, o CEP da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte **aprovou** o referido estudo, bem como o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

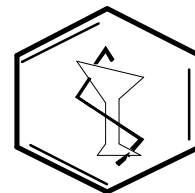
Belo Horizonte, 23 de maio de 2006.

  
Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva  
Coordenador do CEP

## APÊNDICE A - Ficha clínica



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



## FICHA CLÍNICA

**Projeto de pesquisa:** “ESTUDO DA AÇÃO ANTI-AGREGANTE DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM PACIENTES EM USO DESTE MEDICAMENTO”

## 1 – Identificação:

Nome:

---

---

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Naturalidade:

---

Endereço:

Rua (Av.) \_\_\_\_\_ Nº \_\_\_\_\_

Compl. \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ Estado:

---

CEP: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ Telefone:

---



## 2 - Dados:

Sexo: M  F Fumante?: Sim  Não . Se a resposta for não, já fumou antes? Sim  Não Hipertenso(a)?: Sim  Não Diabético (a)?: Sim  Não 

## 3 – Exame clínico:

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ Pressão arterial: \_\_\_\_\_

Medida da cintura: \_\_\_\_\_ Medida do quadril: \_\_\_\_\_

**Já apresentou:**Síndrome Coronariana aguda? Não:  Sim  Quando? \_\_\_\_\_Crise de angina? Não  Sim  Quando? \_\_\_\_\_Acidente Vascular Cerebral? Não  Sim  Quando? \_\_\_\_\_Doença Vascular Periférica? Não:  Sim  Quando? \_\_\_\_\_Doença autoimune? Não:  Sim  Quando? \_\_\_\_\_Doença inflamatória? Não  Sim  Quando? \_\_\_\_\_Doença renal? Não:  Sim  Quando? \_\_\_\_\_Doença hepática? Não:  Sim  Quando? \_\_\_\_\_

Neoplasia? Não:  Sim  Quando? \_\_\_\_\_

Foi submetido (a) a cirurgia nos últimos seis meses? Não:  Sim  Quando? -  
\_\_\_\_\_

Se for do sexo feminino, existe a possibilidade de estar grávida? Não  Sim

**Medicamentos em uso:**

Antiinflamatório: Não  Sim

Antiácido: Não  Sim

Hipoglicemiante oral: Não  Sim

Insulina: Não  Sim

Anticoagulante oral: Não  Sim

Heparina: Não  Sim

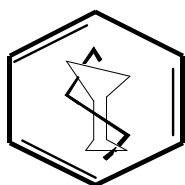
Anti-agregante plaquetário: Não  Sim

Estatina: Não  Sim

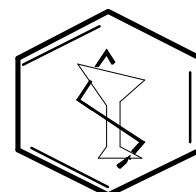
Outros medicamentos: \_\_\_\_\_

Já fez uso de AAS anteriormente de forma constante? Não  Sim

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PROJETO DE PESQUISA: “ESTUDO DA AÇÃO ANTI-AGREGANTE DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM PACIENTES EM USO DESTE MEDICAMENTO”

Prezado Sr.(a),

O objetivo deste projeto é investigar as mudanças no seu processo de coagulação sangüínea que podem ocorrer em resposta ao uso de ácido acetilsalicílico, também conhecido como aspirina, para verificar se este medicamento está sendo realmente eficaz na prevenção de derrames e infartos cardíacos. Este conhecimento permitirá que o tratamento para prevenir estas doenças seja mais eficiente.

A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional farmacêutico, com capacidade técnica e experiência que estará atento para fazer a compressão imediata do local da punção, visando estancar o sangramento. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta.

Você está sendo convidado (a) para participar desta pesquisa como voluntário (a), sem custo algum pelos exames realizados. Se você quiser participar, poderá

fazê-lo doando 20 mL de seu sangue e 10 mL de urina, em 2 momentos, para uso nesta pesquisa, sendo este material armazenado em condições adequadas para pesquisas relacionadas ao uso de AAS.

Além disso, parte do material será armazenada em um banco de amostras biológicas para estudos futuros de variados polimorfismos genéticos. Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo. Se você não quiser participar, não tem problema, não irá atrapalhar o seu tratamento e a assistência recebida pelo seu médico. Para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa, você deverá contatar por telefone as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria das Graças Carvalho

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Telefone: (31) 3409-6881

Farmacêutica - Bioquímica Lillian Harboe Gonçalves

Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Telefone: (31) 9406-3916

NOME:

\_\_\_\_\_

Documento de Identificação:

\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!

Comitê de Ética em Pesquisa –COEP - UFMG

Av. Presidente Antônio Carlos 6627 – Prédio da Reitoria 7º andar, sala 7018 . CEP 31270-901 Tel. (31) 3409 4592.

**APÊNDICE C - Protocolo para extração de DNA****EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL COLHIDO EM EDTA**

1. Pipetar 900  $\mu\text{L}$  de solução de lise de hemácias (solução 1) para um tubo tipo eppendorf.
2. Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de sangue total ao tubo tipo eppendorf contendo a solução de lise de hemácias.
3. Incubar a mistura por 10 minutos a temperatura ambiente, invertendo o tubo de 5 a 6 vezes durante a incubação.
4. Centrifugar a 14.000rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
5. Desprezar o máximo possível do sobrenadante sem desfazer o pellet. Se o pellet ainda contiver hemácias, adicionar mais 600  $\mu\text{L}$  de solução de lise e repetir o procedimento acima.
6. Homogeneizar as amostras vigorosamente, com batidas no tubo, para ressuspender o pellet.
7. Adicionar 300  $\mu\text{L}$  da solução de lise nuclear (solução 2) e homogeneizar a solução com a ponteira 5 a 6 vezes (a solução pode ficar viscosa).
8. Adicionar 150  $\mu\text{L}$  da solução de precipitação de proteínas (solução 3).
9. Misturar no vórtex por 20 a 30 segundos.
10. Centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.
11. Transferir o sobrenadante para outro tubo tipo eppendorf contendo 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol e misturar, no mínimo, 20 vezes.
12. Centrifugar a 14.000rpm por 3 minutos.
13. Desprezar rapidamente o sobrenadante e adicionar 300  $\mu\text{L}$  de etanol a 70%, inverter o tubo várias vezes (observar o precipitado de DNA).
14. Centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.

15. Desprezar o sobrenadante.
16. Secar o pellet invertendo o tubo sobre um papel absorvente e depois manter por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.
17. Adicionar 50 $\mu$ L de solução de hidratação.
18. Fechar bem os tubos, manter a temperatura ambiente por cerca de 12 horas ou incubar a 65°C por 1 hora.
19. Estocar em geladeira (2 a 8°C) por 10 dias ou indefinidamente em freezer a -20°C.

**APÊNDICE D - Preparo de reagentes****SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DE DNA****a) SOLUÇÃO DE LISE DE HEMÁCIAS**

Tris base 0,205 g

Cloreto de amônio 0,77g

Água miliQ estéril qsp 100 mL

Acertar o pH com HCL se necessário

**b) SOLUÇÃO DE LISE DE LEUCÓCITOS**

NAOH 0,8g

SDS 1,0g

Água miliQ estéril qsp 100mL

Aquecer a 68°C para dissolver o SDS

**c) SOLUÇÃO DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEINAS**

Acetato de Amônio 28,75g

Água miliQ estéril qsp 50mL

Esterilizar por filtração. Não autoclavar.

**d) SOLUÇÃO DE HIRATAÇÃO**

Tris base 6,055g

Água estéril qsp 50mL

Ajustar pH com HCL

Autoclavar.

**e) EDTA 0,5 M pH 8,0**

EDTA 9,305g

Água mili Q qsp 50mL

**f) TE(LOW) pH 8,0 - SOLUÇÃO DE USO**

Tris HCL 0,5 mL

EDTA 0,5 0,1 mL

Água miliQ estéril qsp 50mL

**g) ÁLCOOL 70%**

Álcool etílico absoluto 70,0mL

Água miliQ estéril qsp 100 mL

**h) ÁLCOOL 95%**

Álcool absoluto 95mL

Água miliQ estéril qsp 100mL

**i) SDS 10%**

SDS 10g

Água miliQ estéril qsp 100ml

Aquecer a 68°C para dissolver o SDS



**SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PREPARO DO GEL PARA ELETROFORESE****a) TBE 5X**

Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5M pH 8,0	20 mL
Água bidestilada qsp	1000 mL

Conservar à temperatura ambiente.

**b) SOPA PRIMITIVA 6% (PAGE 6%)**

Acrilamida	58 g
Bisacrilamida	2,0 g
TBE 5X até completar	200 mL
Água bidestilada qsp	1000 mL

Usar máscara e óculos para o manuseio.

Conservar resfriado.

**c) PERSULFATO 10%**

Persulfato de amônio	30 g
Água	300 mL

Misturar o persulfato e água.

Não respirar em cima da mistura – tóxico.

Conservar resfriado.

**d) TBE 1%**

TBE 5X	200 mL
Água bidestilada qsp	1000 mL

Conservar à temperatura ambiente.

**SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO DO GEL DE ACRILAMIDA PELO NITRATO DE PRATA****a) SOLUÇÃO FIXADORA**

Etanol pa.	5 mL
Ácido acético	250 µl (15 gotas)
Água bidestilada qsp	45 mL

Conservar à temperatura ambiente.

**b) SOLUÇÃO CORANTE = NITRATO DE PRATA 0,2%**

AgNO <sub>3</sub>	15 g
Água bidestilada	50 mL

Conservar à temperatura ambiente.

**c) SOLUÇÃO REVELADORA****1. Solução de NaOH**

NaOH	1,5 g
Água destilada	50 mL

**2 . Solução de uso**

Solução de NaOH	45 mL
Formaldeído	150 µl

## APÊNDICE E - Protocolo para estudo do polimorfismo da GPIIIa

### PREPARO DO PCR PARA UMA AMOSTRA:

MIX	Volume
H <sub>2</sub> O	10,15 µL
Tampão	1,50 µL
dNTP	1,50 µL
Oligo F	0,60 µL
Oligo R	0,60 µL
Taq	0,15 µL
<b>Total</b>	<b>14,50 µL</b>
<b>DNA</b>	<b>0,50 µL</b>

### DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA UMA AMOSTRA:

MIX	Volume
H <sub>2</sub> O	8,2 µL
Tampão	1,0 µL
<i>MspI</i>	0,5 µL

### ELETROFORESE DA DIGESTÃO:

#### Preparo do gel de poliacrilamida:

- 10 mL de PAGE 8% ou 6% (sopa primitiva)
- 86 µL de APS
- 10 µL de TEMED

**COLORAÇÃO:****1º - fixadora:**

- 5 mL Etanol
- 4,5 mL H<sub>2</sub>O
- 15 gotas de ácido acético

**2º:**

- 50 mL H<sub>2</sub>O
- 0,15g de prata

**3º - reveladora:**

- 10 gotas de formol.
- 45 mL de NaOH.

## APÊNDICE F - Protocolo para estudo do polimorfismo da COX-1

### 1) PREPARO DO PCR PARA UMA AMOSTRA:

#### Protocolo para a 1ª PCR:

MIX	Volume
H <sub>2</sub> O	9,35 µL
dNTP	1,50 µL
Oligo EXT. R	1,00 µL
Oligo EXT. F	1,00 µL
Tampão	1,50 µL
taq	0,15 µL

\*aplicar 0,5 µl de DNA.

#### Protocolo para a 2ª PCR:

MIX	Volume
H <sub>2</sub> O	9,35 µL
dNTP	1,50 µL
Oligo EXT. F	1,00 µL
Oligo INT. F	1,00 µL
Tampão	1,50 µL
taq	0,15 µL

\*aplicar 0,5 µL do produto da 1ª PCR

## 2) DIGESTÃO:

MIX	Volume
H <sub>2</sub> O	10,45 µL
Tampão (NEBuffer 3)	1,50 µL
Enzima <i>Acil</i>	0,05 µL

\* aplicar 3,0 µL do produto da 2ª PCR.

## 3) ELETROFORESE:

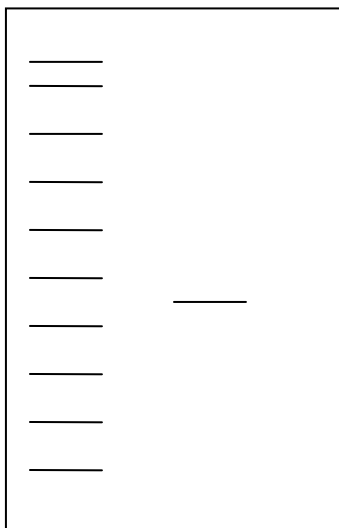
GEL: 10 mL de sopa primitiva 6%

86 µL de APS

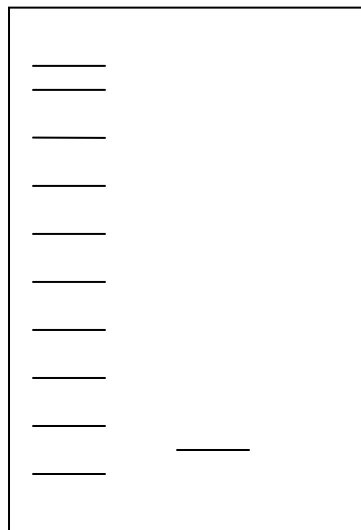
15 µL de TEMED

- aplicar 5 µL de amostra + 5 µL de tampão.

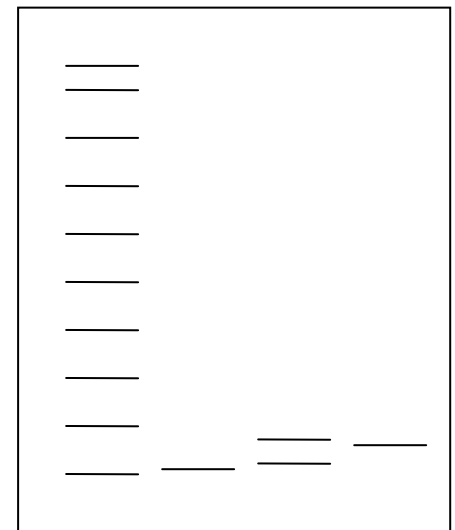
-



Produto da primeira PCR –  
fragmento 484pb



Produto da segunda PCR –  
fragmento 178pb



Produto da digestão enzimática –  
**normal** (158pb); **hétero** ( 178pb +  
158pb); **homo** (178pb)