



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MURILO PORFÍRIO DE AGUIAR

INFLUÊNCIA DO HAPLÓTIPO *CYP2C:7G* NA RESPOSTA AO CLOPIDOGREL EM  
PACIENTES CARDIOVASCULARES

UBERABA-MG  
2024

MURILO PORFÍRIO DE AGUIAR

INFLUÊNCIA DO HAPLÓTIPO *CYP2C:7G* NA RESPOSTA AO CLOPIDOGREL EM  
PACIENTES CARDIOVASCULARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Medicina Translacional, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Fernanda Rodrigues Soares.

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

A23i

Aguiar, Murilo Porfírio de  
Influência do haplótipo CYP2C: TG na resposta ao clopidogrel em  
pacientes cardiovasculares / Murilo Porfírio de Aguiar. -- 2024.  
43 p.: il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024  
Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares

1. Farmacogenética. 2. Clopidogrel. 3. Indutores do citocromo  
P- 450 CYP2C19. I. Soares, Fernanda Rodrigues. II. Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 615:575

MURILO PORFÍRIO DE AGUIAR

**INFLUÊNCIA DO HAPLÓTIPO *CYP2C:7G* NA RESPOSTA AO CLOPIDOGREL EM  
PACIENTES CARDIOVASCULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional” (Linha de Pesquisa: Aspectos Clínicos, diagnósticos e terapêuticos das doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 18 de julho de 2024

**Banca Examinadora:**

Dra. FERNANDA RODRIGUES SOARES – Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. MARCOS DE LUCCA MOREIRA GOMES  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. MARIANA RODRIGUES BOTTON

Hospital das Clínicas de Porto Alegre



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA RODRIGUES SOARES, Professor do Magistério Superior**, em 19/07/2024, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCOS DE LUCCA MOREIRA GOMES, Professor do Magistério Superior**, em 19/07/2024, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Rodrigues Botton, Usuário Externo**, em 19/07/2024, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1296237** e o código CRC **82B3979E**.

## **AGRADECIMENTOS**

Por todos os privilégios que tenho tido ao longo da vida, e por sobreviver a cada dia, agradeço a Deus. De antemão peço perdão por não citar todos os nomes, pois são muitas as boas pessoas que estão ou que passaram em minha vida. Ainda assim, gostaria de citar alguns nomes importantes: minha mãe, Maria; minha irmã, Isabela; minha prima, Ludmila, e sua mãe, Leda. Sem elas, não teria condições de sair do interior para cursar a graduação dos meus sonhos, e ainda mais difícil seria minha jornada no mestrado. Sou profundamente grato, pois sempre estiveram ao meu lado durante meu crescimento e na resolução de todos os transtornos ao longo dos anos.

Sou eternamente grato ao Grupo de Pesquisa em Genética de Populações e Farmacogenética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, liderado pela Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Soares, grupo que me acolheu e se tornou um alicerce em minha vida, como uma família, ajudando-me a amadurecer como pessoa e pesquisador. Sou profundamente encantado pelos trabalhos de pesquisa do grupo e me sinto honrado em fazer parte dele. Aprendi que a ciência não precisa passar por cima das pessoas para acontecer e deve sempre andar ao lado da justiça e da ética, nunca do assédio moral. Levarei essa lição e muitas outras por toda a vida.

Durante minha trajetória para ingressar neste grupo, também tive o privilégio de conhecer várias pessoas incríveis no âmbito acadêmico e de pesquisa. Com muitas delas compartilhei traumas e, com ajuda mútua, superamos desafios. Sou grato a todas as amigas e gentilezas.

Agradeço ao meu companheiro, Lenilson. Desde que o conheci, minha vida mudou para melhor, pois ganhei, além de um namorado, um melhor amigo.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro que me permitiu dedicar-me ao trabalho científico.

Agradeço a toda equipe da Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro por todo suporte, e por tornar possível minha formação.

Gostaria de prestar uma homenagem especial, em memória de Karina e Pedro, cuja influência e apoio, mesmo após suas partidas, continuam a guiar e inspirar meus passos.

## RESUMO

O clopidogrel é um pró-fármaco antiplaquetário essencial na prevenção de eventos trombóticos em pacientes cardiovasculares, especialmente após a colocação de *stents*. No entanto, a variabilidade na resposta ao tratamento, atribuída em parte às variantes do gene *CYP2C19*, desafia a eficácia do medicamento. O haplótipo *CYP2C:TG* do gene adjacente foi recentemente associado a uma maior expressão da enzima *CYP2C19*, mas essa afirmação ainda é controversa na literatura e não há estudos com pacientes cardiovasculares brasileiros com tal variante. Este estudo visa elucidar o impacto do haplótipo *CYP2C:TG* na resposta ao clopidogrel em pacientes genotipados para os alelos \*2, \*3 e \*17 do gene *CYP2C19*, usando como desfecho as Unidades de Reação P2Y12 (PRU) obtidas das amostras de sangue dos pacientes. A genotipagem foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real por ensaios *TaqMan*<sup>™</sup>, e a agregometria óptica *point-of-care* foi utilizada para a quantificação da agregação plaquetária. Para correlacionar o haplótipo com os valores de PRU, foi aplicada a análise estatística de regressão linear simples através da linguagem de programação *Python* com o uso da biblioteca *statsmodels*. Os resultados revelam a presença do haplótipo *CYP2C:TG* em 14,29% dos pacientes estudados. A análise do PRU em 56 pacientes genotipados indicou que a presença do haplótipo pode estar associada a menores valores de PRU, sugerindo uma possível influência na resposta ao clopidogrel, embora os dados não tenham mostrado significância estatística. Este estudo destaca a importância de considerar variantes genéticas adicionais, como o haplótipo *CYP2C:TG*, para melhor compreender a farmacogenética do clopidogrel e suas implicações no tratamento de pacientes cardiovasculares.

Palavras-chave: clopidogrel; *CYP2C:TG*; farmacogenética; *CYP2C19*.

## ABSTRACT

Clopidogrel is an essential antiplatelet prodrug in the prevention of thrombotic events in cardiovascular patients, especially after stent placement. However, variability in treatment response, partly attributed to *CYP2C19* gene variants, challenges the drug's efficacy. The *CYP2C:TG* haplotype of the adjacent gene has been recently associated with increased *CYP2C19* enzyme expression, but this claim remains controversial in the literature, and no studies have been conducted with Brazilian cardiovascular patients carrying this variant. This study aims to elucidate the impact of the *CYP2C:TG* haplotype on clopidogrel response in patients genotyped for the *CYP2C19* \*2, \*3, and \*17 alleles, using P2Y12 Reaction Units (PRU) from blood samples as the outcome measure. Genotyping was performed using real-time PCR with TaqMan™ assays, and point-of-care optical aggregometry was used to quantify platelet aggregation. To correlate the haplotype with PRU values, simple linear regression analysis was applied using the Python programming language and the statsmodels library. The results revealed the presence of the *CYP2C:TG* haplotype in 14.29% of the studied patients. PRU analysis in 56 genotyped patients indicated that the presence of the haplotype might be associated with lower PRU values, suggesting a potential influence on clopidogrel response, although the data did not show statistical significance. This study highlights the importance of considering additional genetic variants, such as the *CYP2C:TG* haplotype, to better understand the pharmacogenetics of clopidogrel and its implications in the treatment of cardiovascular patients.

Keywords: clopidogrel; *CYP2C:TG*; pharmacogenetics; *CYP2C19*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama ilustrativo do procedimento de implantação de um <i>stent</i> em uma artéria coronária obstruída.....	10
Figura 2: Ilustração das vias de sinalização envolvidas na ativação plaquetária, um processo fundamental na coagulação sanguínea.....	11
Figura 3: Frequência dos alelos <i>CYP2C19</i> *2, *3, *4 e *17 em diferentes populações ao redor do mundo.....	15
Figura 4: Concentração do metabólito ativo do clopidogrel no plasma sanguíneo após administração de sua dose padrão.....	16
Figura 5: Fluxograma do processo de inclusão dos pacientes ao direcionamento do material biológico para análise laboratorial.....	19
Figura 6: Interface de termociclador para PCR.....	20
Figura 7: Representação gráfica de dados de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) do software StepOne v2.3.....	25
Figura 8: Distribuição dos genótipos do gene <i>CYP2C19</i> entre pacientes em uso do pró-fármaco clopidogrel.....	26
Figura 9: Histograma dos valores de PRU (Unidades de Reação P2Y12) dos pacientes em uso do pró-fármaco clopidogrel.....	28
Figura 10: Distribuição das Unidades de reação P2Y12 (PRU) por genótipo de 56 pacientes antes e depois da genotipagem do haplótipo <i>CYP2C: TG</i> .....	29
Figura 11: Regressão linear simples dos grupos com e sem o haplótipo.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Recomendações de terapia antiplaquetária baseadas no fenótipo <i>CYP2C19</i> .....	13
Tabela 2: Informações técnicas das sondas utilizadas na genotipagem .....	21
Tabela 3: Classificação dos grupos baseada na presença do haplótipo <i>CYP2C:TG</i> e nas variantes do gene <i>CYP2C19</i> .....	22
Tabela 4: Estratégias de análise de dados .....	23
Tabela 5: Características sócio-demográficas dos 56 pacientes genotipados que possuem PRU.....	24
Tabela 6: Frequências alélicas da população do estudo.....	30
Tabela 7: Frequências genotípicas em três grupos populacionais: Nossa população de estudo, e as tribos brasileiras Guarani e Kaingang.....	32
Tabela 8: Resultados da regressão linear simples aplicada em cada grupo.....	33
Tabela 9: Frequência das variantes genotípicas do gene <i>CYP2C19</i> da nossa população de estudo comparada com os dados de Rodrigues-Soares et al. (2018).....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB: Afro-caribenhos em Barbados.  
ACTP: Angioplastia Coronária Transluminal Percutânea  
ADP: Adenosina Difosfato  
ASW: Afro-americanos do sudoeste dos EUA.  
AVC: Acidente Vascular Cerebral  
BEB: Indivíduos de Bengali, Bangladesh.  
CDX: Chineses Dai em Xisshuangbanna, China.  
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa  
CEU: Descendentes europeus vivendo em Utah.  
CHB: Chineses Han de Pequim.  
CHS: Chineses Han do Sul.  
CISNS: El Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud  
CLM: Colombianos de Medellín.  
CPIC: Consórcio Internacional de Implementação da Farmacogenética  
CSV: Valores Separados por Vírgula  
DCV: Doenças Cardiovasculares  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico  
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético  
FIN: Finlandeses.  
GBR: Inglaterra e Escócia.  
GIH: Indianos Gujarati em Houston, Texas.  
GWD: Mandinka na Gâmbia.  
IBS: Ibéricos da Espanha.  
ITU: Indianos Telugu vivendo na Inglaterra.  
JPT: Japoneses em Tóquio.  
KHV: Vietnamitas Kinh.  
LWK: Luhya no Quênia.  
MSL: Mante de Saerra  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
PRU: Unidades de Reação P2Y12  
PJL: Punjabi em Lahore, Paquistão.  
PUR: Porto-riquenhos.  
SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único  
STU: Tâmeis do Sri Lanka vivendo na Inglaterra.  
TSI: Indivíduos da Toscana, Itália.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	12
1.2 CLOPIDOGREL.....	13
1.3 FARMACOGENÉTICA.....	15
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	21
4.2 GENOTIPAGEM.....	23
4.3 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS POPULAÇÕES ONE THOUSAND GENOMES.....	24
4.4 TABULAÇÃO, INTERPRETAÇÃO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	27
5.2 PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM.....	28
5.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO GENE CYP2C19 DOS PACIENTES EM USO DO CLOPIDOGREL.....	29
5.4 VALORES DE UNIDADES DE REAÇÃO P2Y12.....	30
5.5 DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES DE REAÇÃO P2Y12 POR GRUPO.....	31
5.6 ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO HAPLÓTIPO COM OS VALORES DE PRU.....	35
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

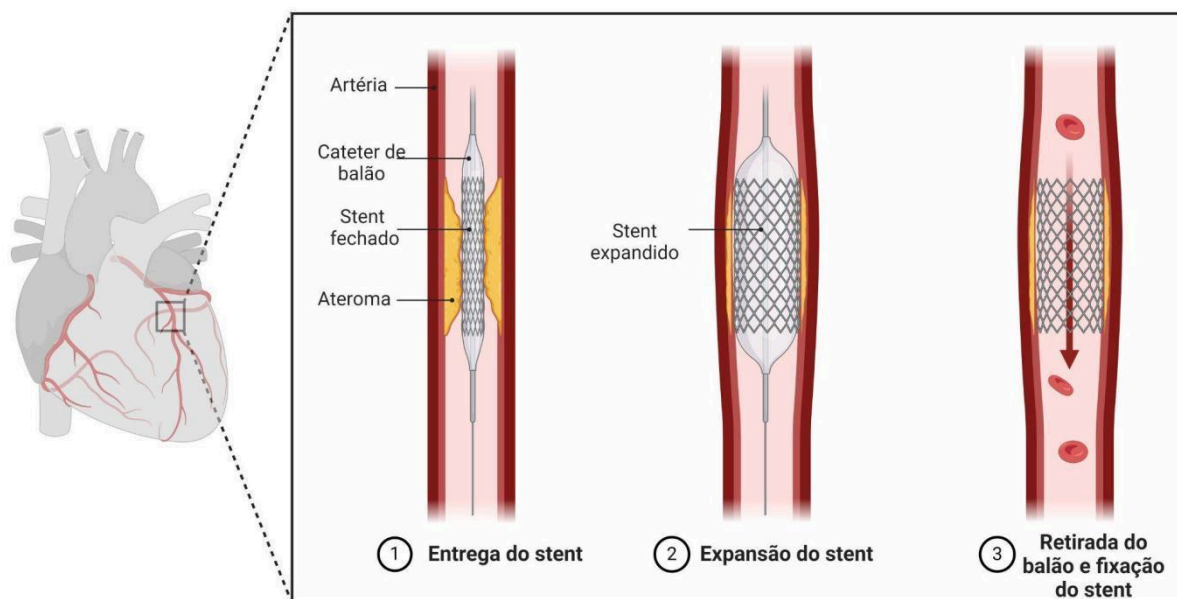
### 1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCVs) representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Entre elas, o infarto do miocárdio é uma das consequências mais graves da doença arterial coronariana, resultando frequentemente na necessidade de intervenções para restabelecer o fluxo sanguíneo adequado ao coração (TODO et al., 2017). Dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde sobre as maiores causas de morte no mundo são referentes ao anos 2000 e 2019, e em ambos os anos as isquemias cardíacas lideraram o ranking de causas de morte, onde o ano de 2019 finalizou com aproximadamente 9 milhões de mortes por isquemia cardíaca, mais que 2 milhões quando comparado ao ano 2000 (WHO, 2020). No Brasil, um estudo verificou uma taxa de 83 mortes por isquemia cardíaca por 100 mil habitantes em 2017, sendo a isquemia cardíaca a principal causa de morte em todos os estados brasileiros (PINHEIRO e JARDIM, 2021).

O infarto do miocárdio ocorre quando o fluxo sanguíneo para uma parte do coração é bloqueado por um longo período, causando danos ou morte ao tecido cardíaco. A aterosclerose, caracterizada pelo acúmulo de placas de gordura nas artérias, é a principal causa dessa obstrução. Quando as placas se rompem, formam-se coágulos sanguíneos que podem obstruir completamente uma artéria coronária (VRANCKX, 2018). Neste contexto, o uso de *stents* coronários e a administração de fármacos, como o clopidogrel, são fundamentais no manejo dessas condições (SHAO et al., 2022).

A revascularização miocárdica, através de angioplastia coronária transluminal percutânea (ACTP) e implantação de *stent*, é uma estratégia chave para restaurar o fluxo sanguíneo no infarto do miocárdio. O *stent*, uma pequena estrutura de malha metálica, é inserido na artéria obstruída para mantê-la aberta (Figura 1). Apesar dos benefícios, a implantação de *stents* pode levar a complicações como a reestenose e a trombose do *stent*, esta última sendo uma emergência médica causada pela formação de um coágulo de sangue no *stent* (ERDOGAN et al., 2022).

**Figura 1:** Diagrama ilustrativo do procedimento de implantação de um *stent* em uma artéria coronária obstruída.



**Fonte:** Disponível em formato editável na plataforma Biorender (<https://www.biorender.com>).

O clopidogrel é um antiagregante plaquetário amplamente utilizado para prevenir a formação de coágulos sanguíneos em pacientes submetidos à ACTP e implantação de *stent*. Atua inibindo o receptor P2Y<sub>12</sub> nas plaquetas, reduzindo a agregação plaquetária. No entanto, a resposta ao clopidogrel pode variar consideravelmente entre os indivíduos, influenciando os resultados clínicos. A resistência ao clopidogrel, caracterizada por uma resposta antiagregante inadequada, está associada a um risco aumentado de eventos trombóticos, incluindo a trombose do *stent* (OSSOLA et al., 2022).

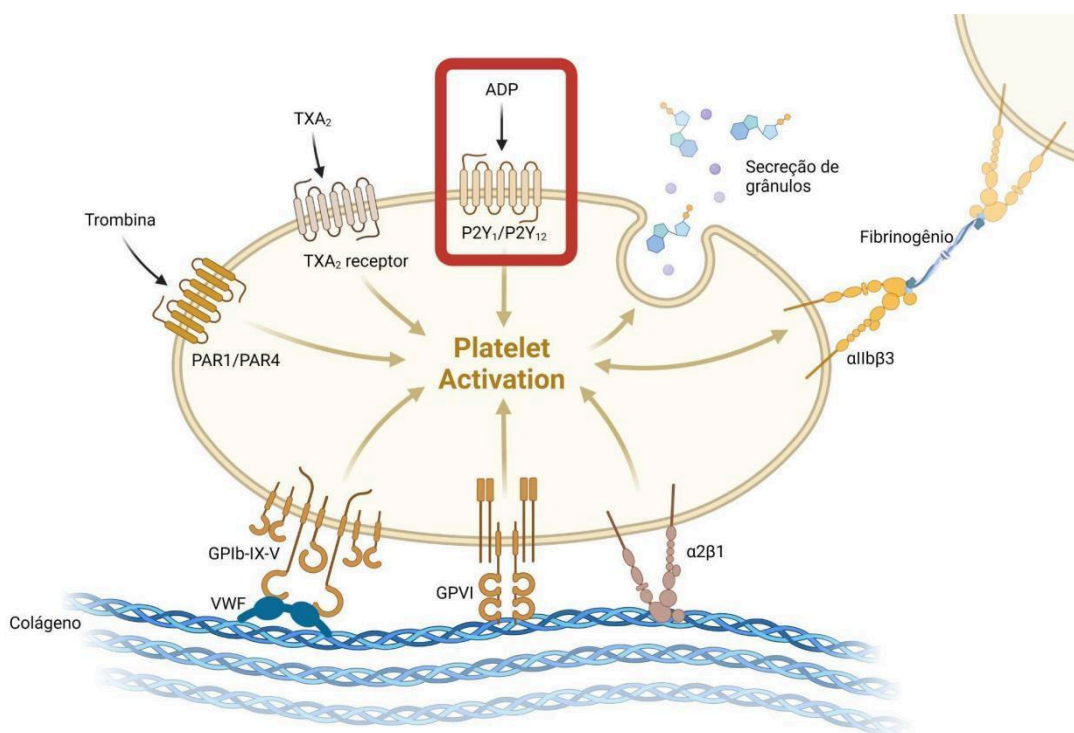
## 1.2 CLOPIDOGREL

O clopidogrel é um pró-fármaco antiplaquetário utilizado para prevenir eventos trombóticos, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC). Sua eficácia e mecanismo de ação, bem como os riscos associados ao seu uso, têm sido amplamente estudados e documentados em diversos estudos científicos (HASANAH, et al., 2022; ISKANDAR, et al., 2022; KUSZYNSKI e LAUVER, 2022).

O clopidogrel foi desenvolvido como uma alternativa aos agentes antiplaquetários existentes, com o objetivo de oferecer uma opção de tratamento mais eficaz e com menor risco de complicações hemorrágicas. Ele atua inibindo o receptor P2Y<sub>12</sub> expresso na membrana das plaquetas, receptor este ativado por adenosinas difosfato (ADP). Isso resulta

na redução da ativação da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , que é fundamental para a ligação das plaquetas ao fibrinogênio e a outras plaquetas, prevenindo a agregação plaquetária excessiva (Figura 2). Esta ação é resultado da conversão do clopidogrel em um metabólito ativo pelo sistema enzimático do citocromo P450, principalmente pela isoforma CYP2C19 (DEAN, 2012).

**Figura 2:** Ilustração das vias de sinalização envolvidas na ativação plaquetária, um processo fundamental na coagulação sanguínea. Ao centro, a 'Plaqueta' é o foco da cascata de eventos. Iniciando na base, o 'Colágeno' exposto devido a uma lesão vascular, ativa as plaquetas através dos receptores 'GPVI' e 'GPIb-IX-V' que interagem com o 'VWF' (Fator de von Willebrand). 'Trombina', um potente ativador plaquetário, liga-se aos receptores 'PAR1/PAR4', promovendo ainda mais a ativação plaquetária. A produção de 'TXA<sub>2</sub>' (Tromboxano A<sub>2</sub>) após a ativação inicial das plaquetas leva à amplificação do sinal através do 'Receptor de TXA<sub>2</sub>'. O 'ADP' é liberado pelas plaquetas e se liga aos receptores 'P2Y<sub>1</sub>/P2Y<sub>12</sub>', destacados na imagem com um retângulo vermelho, que são inibidos por agentes antiplaquetários como o clopidogrel. A 'Secreção de grânulos' contém substâncias que reforçam a ativação plaquetária e a agregação. Finalmente, o 'Fibrinogênio' se liga à 'integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ' (alfa IIb beta 3), permitindo a ligação cruzada das plaquetas e formação do coágulo sanguíneo (CHRISTOPHERSON et al., 2022).



**Fonte:** Disponível em formato editável na plataforma Biorender (<https://www.biorender.com>).

A eficácia do clopidogrel em reduzir eventos cardiovasculares adversos foi demonstrada em diversos estudos clínicos, como o estudo de CAPRIE de 1996, que comparou clopidogrel

com aspirina em pacientes com aterosclerose, mostrando uma redução relativa no risco de eventos vasculares. No entanto, a resposta ao clopidogrel pode variar consideravelmente entre os indivíduos devido também a diferenças genéticas, especialmente as variantes do gene *CYP2C19*, que podem afetar a metabolização do medicamento e, conseqüentemente, sua eficácia. Isso levou ao desenvolvimento de diretrizes de farmacogenética para personalizar o tratamento com clopidogrel, visando melhorar a eficácia do tratamento (OLIE et al., 2021).

Existem métodos para avaliar a eficácia do clopidogrel e como está sendo sua resposta pelos pacientes, porém aplicados ainda exclusivamente no âmbito científico. Uma das ferramentas utilizadas para essa finalidade é o teste de agregometria óptica *point-of-care*, realizado com o agregômetro VerifyNow. Este instrumento mede a agregação plaquetária em uma amostra de sangue do paciente coletada em tubos contendo citrato, fornecendo valores em "PRU", que significa unidades de reação P2Y12. Neste contexto, a transmitância mais alta indica maior agregação plaquetária. Portanto, valores elevados de PRU, especialmente valores iguais ou superiores a 208, apontam para indivíduos resistentes ao clopidogrel. Esta resistência pode levar a uma menor eficácia do tratamento antiplaquetário, aumentando o risco de eventos cardiovasculares adversos (SAMMARTINO et al., 2023).

### 1.3 FARMACOGENÉTICA

A eficácia de diversos medicamentos varia consideravelmente entre indivíduos, devido a uma multiplicidade de fatores como tabagismo, alcoolismo, dieta, gênero, peso e genética, sendo esta última de particular importância em certos casos. Essas variações fundamentaram o desenvolvimento da farmacogenética, uma área da ciência dedicada a explorar a interação entre a genética do indivíduo e sua resposta aos medicamentos. Tal campo promete revolucionar a prática clínica ao oferecer estratégias terapêuticas personalizadas, aumentando a eficácia e segurança do tratamento farmacológico.

A importância da genética do paciente para a eficácia do tratamento com clopidogrel é tão importante que o Consórcio Internacional de Implementação da Farmacogenética (CPIC) elaborou diretrizes passíveis de serem usadas por profissionais de saúde em todo o mundo, extremamente aconselhável para todos os médicos que prescrevem tal medicamento. As recomendações de tratamento são ajustadas com base no fenótipo predito do indivíduo, determinado por suas variantes genéticas. Esse fenótipo indica como o indivíduo metaboliza certos medicamentos, categorizando-os como metabolizadores ultrarrápidos, rápidos, normais, intermediários, ou lentos, dependendo da atividade enzimática (LEE et al., 2022).



Para caracterizar o fenótipo previsto de um indivíduo utilizando essas diretrizes, é essencial conhecer suas características genéticas através de técnicas de genotipagem. No contexto do clopidogrel, sabe-se que polimorfismos específicos no gene *CYP2C19* influenciam a metabolização deste pró-fármaco. Com base em evidências científicas, foi possível padronizar esses polimorfismos em conjuntos denominados “alelos estrela”, representados por um asterisco seguido de um número.

No caso do clopidogrel, os alelos estrela \*2, \*3 e \*17 são os mais relevantes, pois sua genotipagem permite classificar um indivíduo conforme as diretrizes da CPIC (Tabela 1). A genotipagem considera ambos os cromossomos do indivíduo, permitindo combinações de alelos como \*2/\*17. É importante destacar que o alelo \*1 indica a ausência dos alelos investigados (\*2, \*3 e \*17). Nas diretrizes do clopidogrel, os alelos \*2 e \*3 estão associados à função nula da enzima, reduzindo a eficácia do pró-fármaco, enquanto o alelo \*17 está relacionado à metabolização rápida.

**Tabela 1:** Recomendações de terapia antiplaquetária baseadas no fenótipo *CYP2C19*, considerando os principais alelos estrelas relacionados ao clopidogrel (LEE et al., 2022). SCA: Síndrome Coronariana Aguda. ICP: Intervenção Coronária Percutânea. e/ou ICP

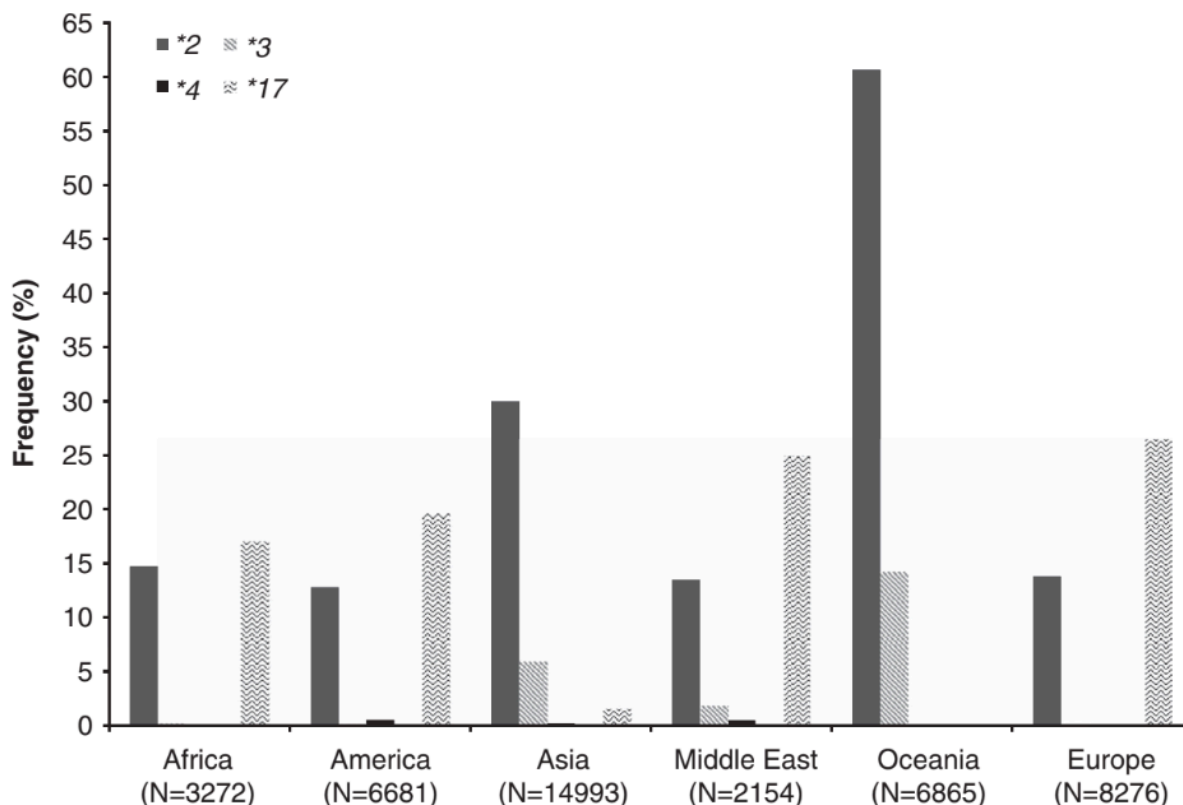
<b>Fenótipo <i>CYP2C19</i></b>	<b>Implicações para medidas fenotípicas</b>	<b>Recomendação Terapêutica</b>	<b>Classificação da recomendação (SCA e/ou ICP)</b>	<b>Classificação da recomendação (Em outras condições)</b>
Metabolizador ultrarrápido  (*17/*17)	Formação aumentada do metabólito ativo do clopidogrel; menor reatividade plaquetária durante o tratamento: sem associação com maior risco de sangramento.	Se considerar o uso de clopidogrel, utilizar a dose padrão (75mg/dia).	Fortemente recomendado	Não há recomendações

Metabolizador rápido (*1/*17)	Formação normal ou aumentada do metabólito ativo do clopidogrel; reatividade plaquetária normal ou reduzida durante o tratamento: sem associação com aumento do risco de sangramento.	Se considerar o uso de clopidogrel, utilizar a dose padrão (75mg/dia).	Fortemente recomendado	Não há recomendações
Metabolizador normal (*1/*1)	Formação normal do metabólito ativo do clopidogrel: reatividade plaquetária normal durante o tratamento.	Se considerar o uso de clopidogrel, utilizar a dose padrão (75mg/dia).	Fortemente recomendado	Fortemente recomendado
Metabolizador intermediário (*1/*2, *1/*3, *2/*17, *3/*17)	Formação reduzida do metabólito ativo do clopidogrel: aumento da reatividade plaquetária durante o tratamento: aumento do risco para eventos adversos cardíacos e cerebrovasculares.	Evite a dose padrão (75 mg) de clopidogrel se possível. Use prasugrel ou ticagrelor na dose padrão se não houver contraindicações.	Fortemente recomendado	Não há recomendações
Metabolizador lento (*2/*2, *3/*3, *2/*3)	Formação significativamente reduzida do metabólito ativo do clopidogrel; aumento da reatividade plaquetária durante o tratamento; aumento do risco para eventos adversos cardíacos e cerebrovasculares.	Evite o clopidogrel se possível. Utilize prasugrel ou ticagrelor na dose padrão se não houver contraindicações.	Fortemente recomendado	Recomendação moderada

É interessante entender que a predominância dos alelos \*2, \*3, e \*17 variam consideravelmente entre as populações no mundo (Figura 3). Devido a isso, é incoerente

generalizar informações a respeito das frequências dessas variantes no mundo baseando-se unicamente em uma população de estudo.

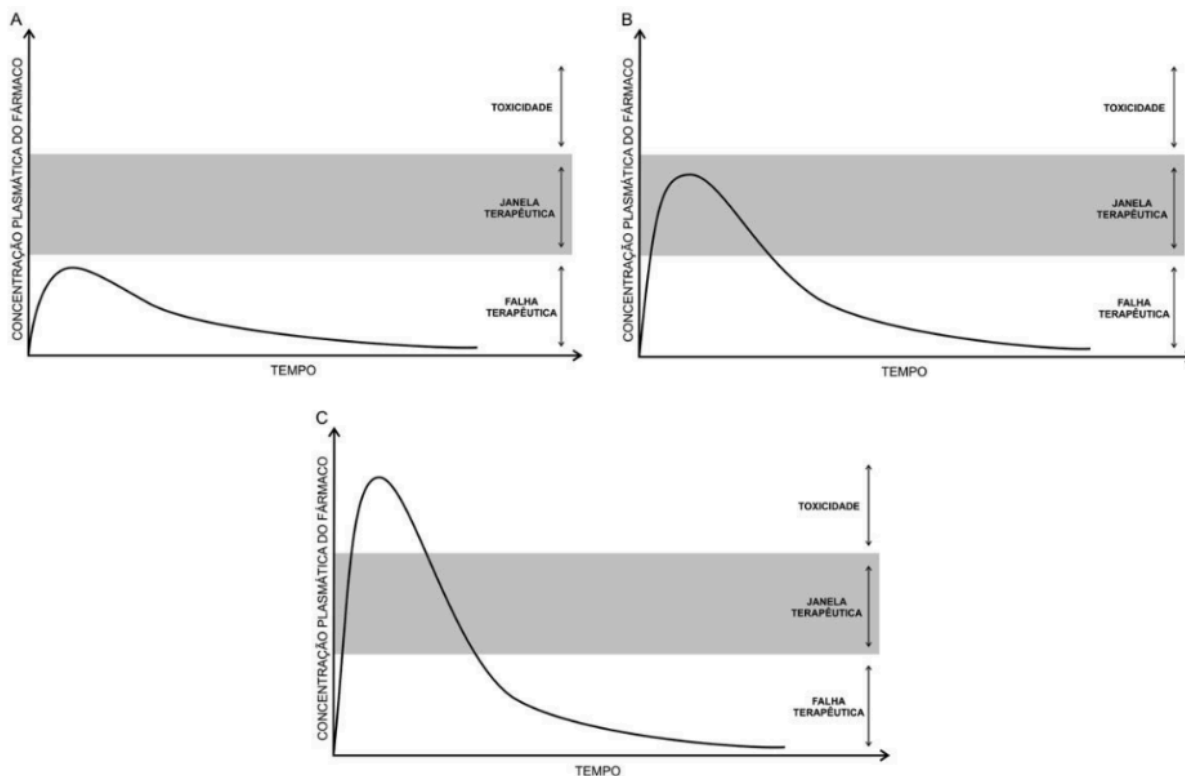
**Figura 3:** Frequência dos alelos *CYP2C19*\*2, \*3, \*4 e \*17 em diferentes populações ao redor do mundo.



**Fonte:** FRICKE-GALINDO et al. 2015.

Por se tratar de um pró-fármaco, ou seja, um medicamento que ingerimos na forma inativa para se tornar ativo após metabolizado por enzimas no fígado, metabolizadores lentos tendem a ter menos metabólitos ativos, enquanto metabolizadores rápidos teriam um pico de metabólito ativo maior em um prazo mais curto de tempo (Figura 4), predispondo os pacientes a diferentes consequências, como os lentos à falha no tratamento. Embora se acredite teoricamente que metabolizadores rápidos, por apresentarem níveis mais elevados do medicamento em um curto período, estejam mais predispostos aos efeitos adversos, não há evidências científicas significativas que comprovem essa predisposição com relação especificamente ao clopidogrel. Portanto, não há diretrizes que recomendem prescrições diferentes de clopidogrel para metabolizadores rápidos. A recomendação de prescrição do clopidogrel para esses pacientes é idêntica àquela para pacientes com metabolismo normal.

**Figura 4:** Concentração do metabólito ativo do clopidogrel no plasma sanguíneo após administração de sua dose padrão. A) Concentração plasmática de uma metabolização lenta; B) Concentração plasmática suficiente para alcançar a janela terapêutica (normal); C) Concentração plasmática excedente à janela terapêutica, de uma metabolização ultrarrápida.



**Fonte:** SCUDELER e SOARES, 2020.

A pesquisa em torno do clopidogrel evidenciou que, embora alguns pacientes não apresentem as variantes comumente associadas à sua metabolização atípica, ainda assim podem exibir alterações no teste de reatividade plaquetária (KAMBHAMPATI, et al., 2023). Os casos de particular interesse são aqueles com níveis elevados de PRU, os quais indicam um risco aumentado de eventos trombóticos e complicações cardiovasculares subsequentes, por falha terapêutica. Em contrapartida, a associação entre baixos níveis de PRU e uma predisposição a hemorragias espontâneas permanece controversa (AIZAWA, et al., 2023).

Recentemente, um estudo levantou um possível motivo pelo qual indivíduos sem variantes no gene *CYP2C19* ainda podem manifestar uma resposta variada à atividade da enzima *CYP2C19*. A pesquisa identificou um haplótipo no gene adjacente *CYP2C18*, conhecido como *CYP2C: TG*, que influencia a expressão da enzima *CYP2C19*. Haplótipos são conjuntos de alelos localizados em *loci* próximos em um cromossomo que, geralmente, são herdados juntos, representando uma combinação específica de variantes genéticas que

podem influenciar diversas características fenotípicas, incluindo a resposta a medicamentos (ZUBIAUR e GAEDIGK, 2022).

O haplótipo *CYP2C:TG* é caracterizado por dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), denominados rs2860840 e rs11188059 (ZUBIAUR e GAEDIGK, 2022). SNPs são variações genéticas que ocorrem em um único nucleotídeo (NOVROSKI, 2023). Essas variações são cruciais para a pesquisa científica, pois permitem a associação de características fenotípicas específicas, incluindo doenças, a determinados genótipos. Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) são particularmente valiosos nesse contexto, explorando dados genéticos de larga escala para identificar correlações entre SNPs e traços fenotípicos, exigindo um rigor estatístico tal que somente achados com um valor de  $p$  inferior a  $5 \times 10^{-8}$  são considerados estatisticamente significativos (WALSH, et al., 2023).

Portanto, a farmacogenética representa uma fronteira promissora na medicina personalizada, possibilitando a otimização de terapias farmacológicas com base na composição genética individual. O estudo do clopidogrel e a descoberta de haplótipos influenciadores, como o *CYP2C:TG*, ilustram o potencial dessa abordagem para aprimorar a eficácia e segurança do tratamento, enfatizando a importância de uma pesquisa contínua e detalhada na interseção entre genética e farmacologia. A aplicação desse conhecimento pode ser possível através de técnicas de laboratório, como PCR em tempo real, que nos permite genotipar um indivíduo através de sua amostra de sangue. Com a genotipagem do indivíduo, é possível classificá-lo como metabolizador lento, intermediário, normal, rápido ou ultrarrápido, nos permitindo aplicar cuidados dispostos em diversos guias e diretrizes de diversas fontes, como as do CPIC.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Este trabalho é justificado pela observação de que uma variedade de pacientes apresenta respostas terapêuticas variáveis ao uso do clopidogrel. Embora essas variações na eficácia frequentemente sejam atribuídas a variantes genéticas conhecidas, uma parcela significativa dos pacientes não possui essas características genéticas, mas ainda assim experimenta diferentes níveis de eficácia no tratamento. Isso sugere a possibilidade de que tais variações estejam associadas à presença de biomarcadores farmacogenéticos ainda não rotineiramente avaliados, como, por exemplo, o haplótipo *CYP2C:TG*. O reconhecimento deste haplótipo como influenciador da metabolização do clopidogrel pode abrir portas para novos painéis genéticos e novas abordagens terapêuticas, otimizando a eficácia do tratamento para muitos pacientes cardiovasculares.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se o haplótipo *CYP2C:TG* influencia a resposta ao tratamento com clopidogrel em pacientes cardiovasculares pós-angioplastia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

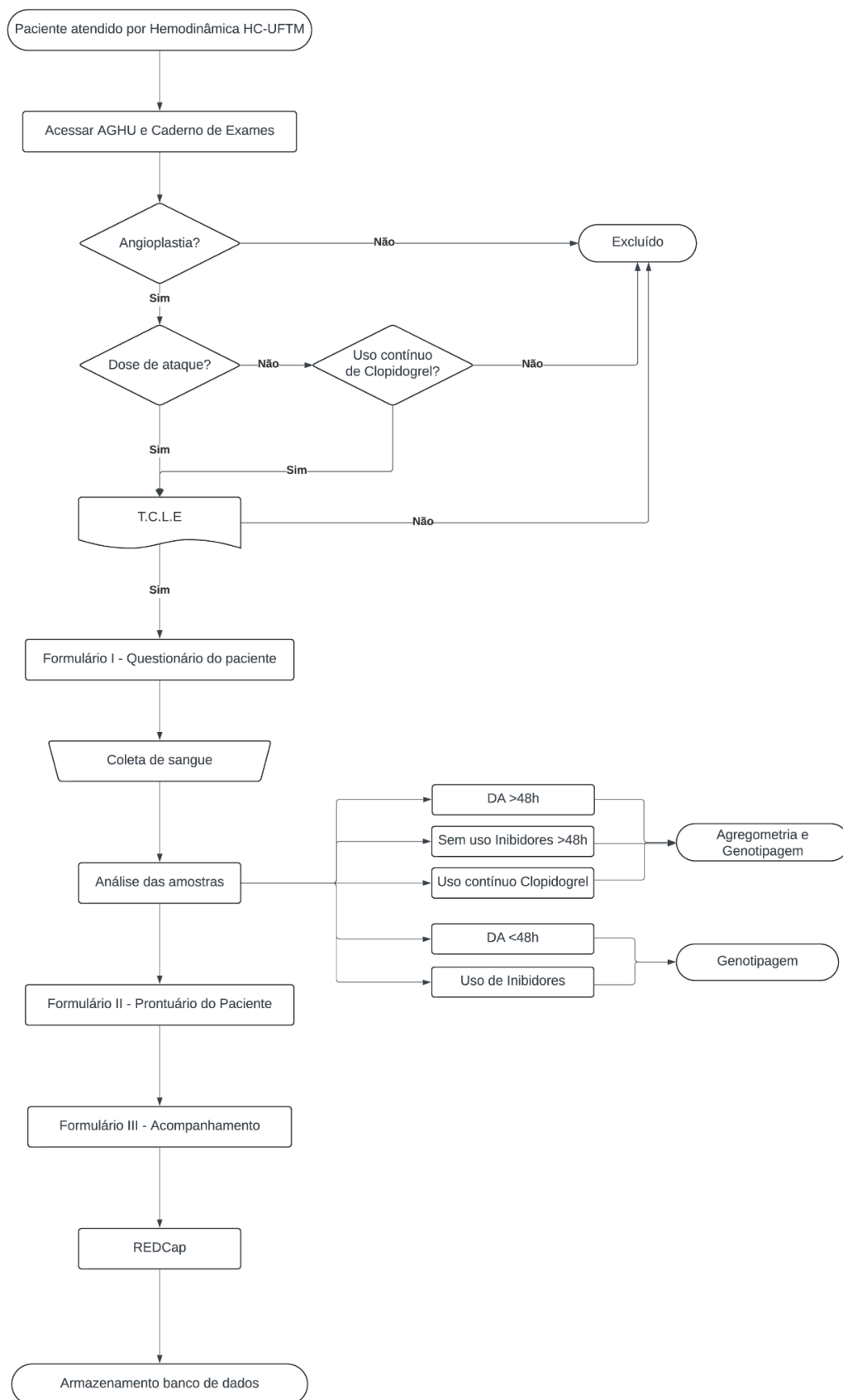
- Genotipar e investigar a frequência das variantes rs4244285 (\*2), rs4986893 (\*3) e rs12248560 (\*17) do gene *CYP2C19*, bem como das variantes rs2860840 e rs11188059 associadas ao haplótipo *CYP2C:TG*, na população estudada e compará-las com a literatura existente e com os dados públicos do *One Thousand Genomes*;
- Quantificar os valores de Unidades de Reação P2Y12 (PRU) nas amostras coletadas;
- Verificar se a presença do haplótipo *CYP2C:TG* está associada à variabilidade na resposta ao tratamento com clopidogrel nos pacientes estudados.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho integra um projeto mais amplo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFTM sob o número 71061822.4.1001.5154, focado na genotipagem de pacientes cardiovasculares internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. O estudo aborda pacientes que necessitaram de implantação de *stents* e uso subsequente do medicamento clopidogrel. O projeto envolve a coleta de amostras e a medição dos níveis de agregação plaquetária para obter dados de PRU, além da genotipagem dos alelos \*2, \*3 e \*17 do gene *CYP2C19* e o haplótipo *CYP2C:TG* do gene *CYP2C18* usando a técnica de PCR em tempo real por ensaios *TaqMan*<sup>™</sup>, conforme demonstrado no seguinte fluxograma (Figura 5).

**Figura 5:** Fluxograma do processo de inclusão dos pacientes ao direcionamento do material biológico para análise laboratorial. T.C.L.E: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. DA: Dose de ataque.

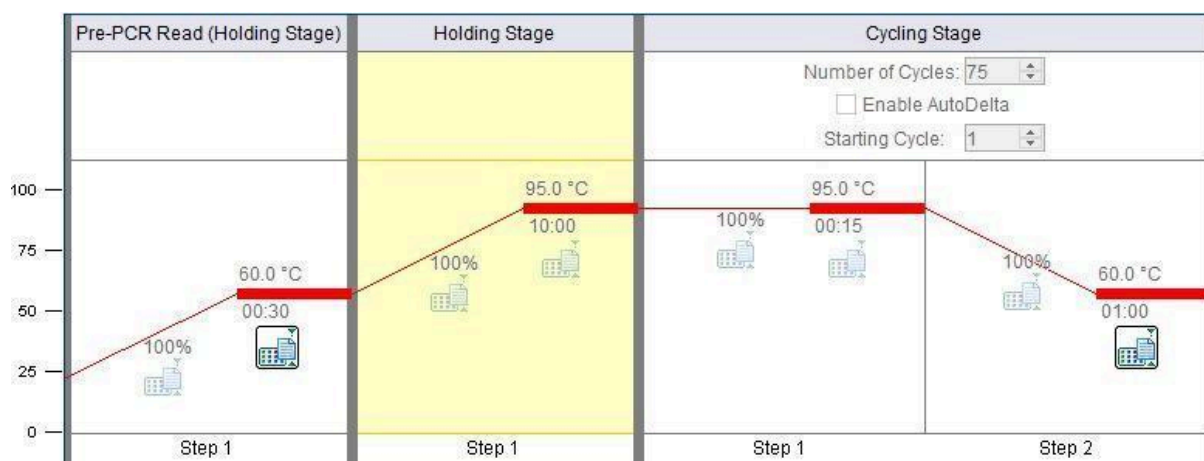


Fonte: Acervo pessoal.

## 4.2 GENOTIPAGEM

O DNA foi isolado de amostras de sangue total conservadas em tubos contendo Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), utilizando o kit PureGene™ (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo os procedimentos estabelecidos pelo Grupo de Pesquisa em Genética de Populações e Farmacogenética da UFTM. Após a extração, a integridade e concentração do DNA foram analisadas por espectrometria e fluorometria utilizando o equipamento NanoDrop e Qubit, respectivamente. Com base nesses resultados, as amostras foram ajustadas para uma concentração de 10ng/μL. Posteriormente, realizou-se a técnica de PCR em tempo real nessas amostras, empregando o *TaqMan*™ Universal PCR Master Mix e as sondas *TaqMan*™ C\_\_11201742\_10 (rs2860840) e C\_\_31983321\_10 (rs11188059) para o haplótipo, e as sondas *TaqMan*™ C\_\_25986767\_70 (rs4244285), C\_\_27861809\_10 (rs4986893) e C\_\_469857\_10 (rs12248560) para as variantes do gene *CYP2C19*. O processo foi conduzido no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System do Laboratório de Imunologia da UFTM, seguindo um protocolo de ciclos de temperatura específicos (Figura 6).

**Figura 6:** Interface de termociclador para PCR com três etapas: pré-leitura a 60°C por 30 segundos, seguida de um estágio de manutenção a 95°C por 10 minutos e uma etapa de ciclagem com 75 ciclos, iniciando com uma fase a 95°C por 15 segundos e finalizando com 60°C por 1 minuto.



**Fonte:** *Print Screen* da interface de termociclagem do software StepOne v2.3.

Após a qPCR por ensaios *TaqMan*™, os gráficos foram analisados com o software StepOne v2.3 e exportados em formato XLS com organização padrão do software. A inferência dos genótipos de cada indivíduo foi então feita manualmente, observando a amplificação das fluorescências VIC/FAM (Tabela 2), sendo os dados reorganizados e tabulados em um segundo arquivo XLS para facilitar e se adequar às exigências da linguagem de programação *Python*.



**Tabela 2:** Informações técnicas das sondas utilizadas na genotipagem (20X e 40X Drug Metabolism Genotyping Assay Mix).

<b>Catalog number</b>	<b>Sonda (ID)</b>	<b>Sequência [VIC/FAM]</b>	<b>SNP</b>	<b>Alelo estrela</b>
4362691	C__25986767_70	TTCCCACTATCATTGATTATTTCCC[A>G] GGAACCCATAACAAATTACTTAAAA	rs4244285	*2
4362691	C__27861809_10	ACATCAGGATTGTAAGCACCCCCTG[A>G] ATCCAGGTAAGGCCAAGTTTTTTGC	rs4986893	*3
4362691	C__469857_10	AAATTTGTGTCTTCTGTTCTCAAAG[C>T] ATCTCTGATGTAAGAGATAATGCGC	rs12248560	*17
4362691	C__11201742_10	GGCAGATAGTTTGGCTGCTCCTGTG[C>T] TGTCACCTGCAATTCTCCCTTATCA	rs2860840	-
4351379	C__31983321_10	TGTATGCTTAATCTTTGGAGAAACC[A>G]T GGCTGGATCAAAGACCTAAATGTA	rs11188059	-

Os alelos \*2, \*3 e \*17 do gene *CYP2C19* foram os escolhidos para a genotipagem pois são as variantes mais relevantes no contexto do clopidogrel, e já há um padrão na literatura científica sobre a investigação dessas variantes nos estudos que abordam fenótipo predito.

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS POPULAÇÕES *ONE THOUSAND GENOMES*

As análises de frequências alélicas e ancestralidade foram realizadas na plataforma R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), utilizando um arquivo VCF contendo os dados genômicos dos indivíduos. A análise de fase do haplótipo foi realizado com o pacote *HaploStats*, também na plataforma R, para identificar quais alelos dos SNPs de interesse (rs2860840 e rs11188059) estão co-localizados no mesmo cromossomo nos indivíduos. O software atribuiu uma probabilidade ao haplótipo de cada indivíduo, sendo selecionadas as probabilidades maiores que 95%. Com isso, foi possível calcular as frequências do haplótipo e relacioná-las com a ancestralidade dos indivíduos.

#### 4.4 TABULAÇÃO, INTERPRETAÇÃO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados para este trabalho foram organizados em um arquivo no formato XLS, dividindo os indivíduos em 10 grupos conforme padronização de Bråten et al. (2021) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Os grupos genéticos são definidos com base na presença do haplótipo *CYP2C:TG* e nas variantes do gene *CYP2C19*. Pacientes sem o haplótipo *CYP2C:TG* são categorizados apenas pelos alelos \*2, \*3 e \*17. Aqueles que não possuem os alelos \*2, \*3 e \*17 são classificados como '\*1'. Pacientes com o haplótipo em um ou ambos os cromossomos são caracterizados como TG ou TG/TG, respectivamente, juntamente com seu alelo estrela correspondente. Essa classificação segue o estudo de Bråten et al. (2021).

Diplótipo sem <i>CYP2C:TG</i>	Diplótipo com <i>CYP2C:TG</i>
*1/*1	*1/*1TG
*1/*2	*1TG/*2
*1/*17	*1TG/*1TG
*17/*17	*1TG/*17
*17/*2	
*2/*2	

Neste estudo, indivíduos foram genotipados para os alelos \*2, \*3 e \*17 do gene *CYP2C19* e para as duas variantes que correspondem ao haplótipo *CYP2C:TG* utilizando a técnica de PCR em tempo real por ensaios *TaqMan*<sup>™</sup>, sequencialmente submetendo os dados à análise de fase. Para a análise de normalidade dos dados PRU quantificados nos indivíduos genotipados, foram empregados os testes de Shapiro-Wilk, D'Agostino-Pearson e Anderson-Darling com o uso da biblioteca *statsmodels* por linguagem de programação *Python*.

Analisamos a influência do haplótipo na predisposição para valores mais altos ou mais baixos de PRU, utilizando o teste estatístico de regressão linear simples. Para que os resultados da regressão sejam coerentes, é essencial utilizarmos dois conjuntos de dados simultaneamente em uma única análise: um conjunto com a característica de interesse (presença do haplótipo) e outro sem ela. Por exemplo, realizamos uma regressão linear comparando todos os valores de PRU de indivíduos com o genótipo \*17/\*17, considerando tanto aqueles com quanto sem o haplótipo. Isso nos permite avaliar especificamente a influência do haplótipo em indivíduos com este genótipo particular, já que é possível que a influência do haplótipo varie de acordo com a genotipagem do gene *CYP2C19*.

Considerando que a presença ou ausência do haplótipo é uma variável qualitativa, a convertemos em dados binários, atribuindo 1 para presença e 0 para ausência do haplótipo. Isso facilita a aplicação da regressão linear simples. Conforme sugerido por James et al. na obra '*An Introduction to Statistical Learning*' (2017), essa abordagem permite uma análise efetiva. Limitamos nossos testes a quatro grupos, conforme especificado na Tabela 4, onde essa comparação é possível.

**Tabela 4:** Estratégias de análise de dados que nos permitem abordar questões-chave por meio da aplicação de regressão linear simples. As estratégias foram elaboradas para atender ao requisito crítico de que todos os indivíduos estudados tenham perfis genéticos comparáveis no gene *CYP2C19*, incluindo aqueles com e sem o haplótipo *CYP2C:TG*.

Conjunto de dados	Pergunta norteadora
Grupo 1 e Grupo 2	
*1TG / *2 e *1 / *2	A presença do haplótipo <i>CYP2C:TG</i> em um único alelo afeta a média de PRU de indivíduos portadores de um alelo *2?
*1 / *1TG e *1 / *1	A presença do haplótipo <i>CYP2C:TG</i> em um único alelo afeta a média de PRU de indivíduos sem os alelos *2, *3 ou *17?

*1TG / *1TG e *1 / *1	A presença do haplótipo <i>CYP2C:TG</i> nos dois alelos afeta a média de PRU de indivíduos sem os alelos *2, *3 ou *17?
*1TG / *17 e *1 / *17	A presença do haplótipo <i>CYP2C:TG</i> em um único alelo afeta a média de PRU de indivíduos portadores de um único alelo *17?
*1TG/ *2, *1 / *1TG, *1TG / *1TG e *1TG / *17 e *1 / *2, *1 / *1, *1 / *1 e *1 / *17	A presença do haplótipo <i>CYP2C:TG</i> afeta a média de PRU de indivíduos independentemente de suas variantes no gene <i>CYP2C19</i> ?

Todo o procedimento foi feito através da plataforma Google Colab, por uso da linguagem de programação *Python*, usando os pacotes de gráficos e estatística, *matplotlib* e *statsmodels*, respectivamente. Os códigos utilizados estão vinculados ao autor e dispostos na plataforma de programação computacional *GitHub* (<https://github.com/MuriloPorfirio>).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Dos 146 pacientes genotipados para os alelos \*2, \*3 e \*17 do gene *CYP2C19*, 56 também foram genotipados para o haplótipo *CYP2C:TG* e possuem valores de PRU. A idade média desses pacientes é de 61,19 anos. Dentre os 56 pacientes, a maioria se declarou parda (41%) e a maioria é composta por homens (62%) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Características sócio-demográficas dos 56 pacientes genotipados que possuem PRU.

	N	%
<b>Sexo</b>		
Mulheres	21	37.5
Homens	35	62.5
<b>Idade média (Anos)</b>	61,19	
<b>Peso médio (Kg)</b>	75,34	

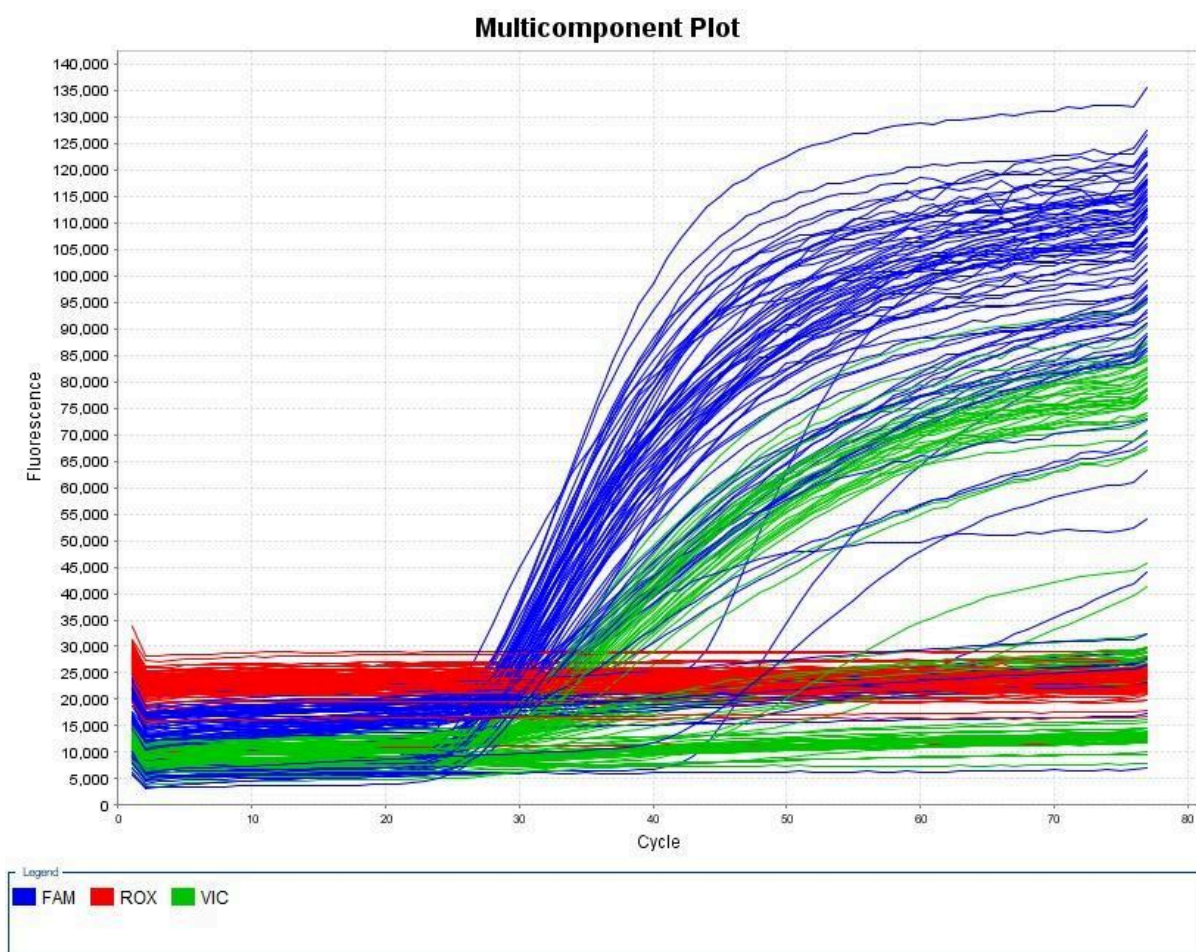
<b>Etnia</b>			
	Pretos	11	(19.65%)
	Pardos	23	(41.07%)
	Amarelos	2	(3.57%)
	Branco	18	(32.14%)
	Não declarada	2	(3.57%)
<b>Hipertensão Arterial Sistêmica</b>		44	(78.5%)
<b>Diabetes mellitus tipo 1 e 2</b>		19	(33.9%)

**Fonte:** Acervo próprio.

## 5.2 PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM

A realização da PCR em tempo real por ensaios *TaqMan*<sup>TM</sup> com as condições de ciclagem descritas na metodologia possibilitou o sucesso da amplificação das diferentes sondas referentes aos três alelos estrela do gene *CYP2C19* e as duas variantes que compõem o haplótipo *CYP2C:TG* em uma mesma placa de 96 poços (Figura 7), possibilitando uma padronização quando trabalhando com tais sondas simultaneamente. O número de ciclos se justifica na característica da sonda referente ao alelo \*17 ser mais lenta durante a sua amplificação.

**Figura 7:** Representação gráfica de dados de qPCR do software StepOne v2.3, mostrando a amplificação de 30 amostras distintas em três fluoróforos diferentes: FAM (azul), VIC (verde) e ROX (vermelho). Cada linha representa a fluorescência detectada em um ciclo de PCR individual, evidenciando a variabilidade dos alelos entre os poços.

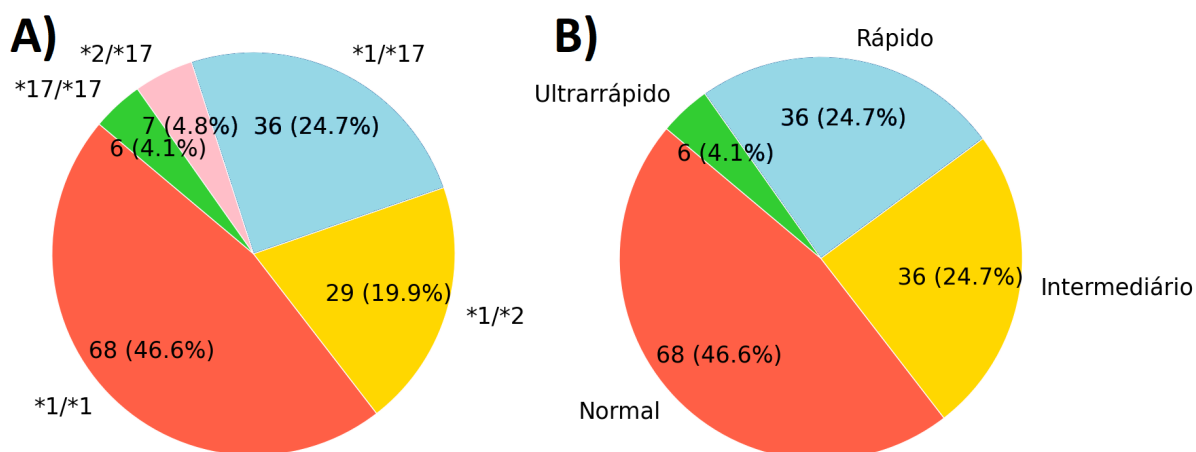


**Fonte:** Do próprio autor.

### 5.3 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E DE FENÓTIPOS PREDITOS DO GENE *CYP2C19* DOS PACIENTES EM USO DO CLOPIDOGREL

Neste estudo, 146 pacientes foram genotipados e divididos em grupos baseados nos alelos \*1, \*2, \*3 e \*17 do gene *CYP2C19*. A maior parte dos pacientes estão no grupo heterozigoto com o alelo \*17 (24.7%), seguido por heterozigotos do alelo \*2 (19.9%), homozigotos do alelo \*17 (4.1%) e heterozigotos com os alelos \*2 e \*17 (4.8%). Não houve nenhum indivíduo com o alelo \*3, e nenhum paciente homozigoto para o alelo \*2 (Figura 8).

**Figura 8:** O gráfico de pizza exibe a distribuição dos genótipos (A) e dos fenótipos preditos (B) do gene *CYP2C19* entre 146 pacientes que estão utilizando o medicamento clopidogrel. Cada segmento colorido representa a proporção de pacientes com um genótipo específico.

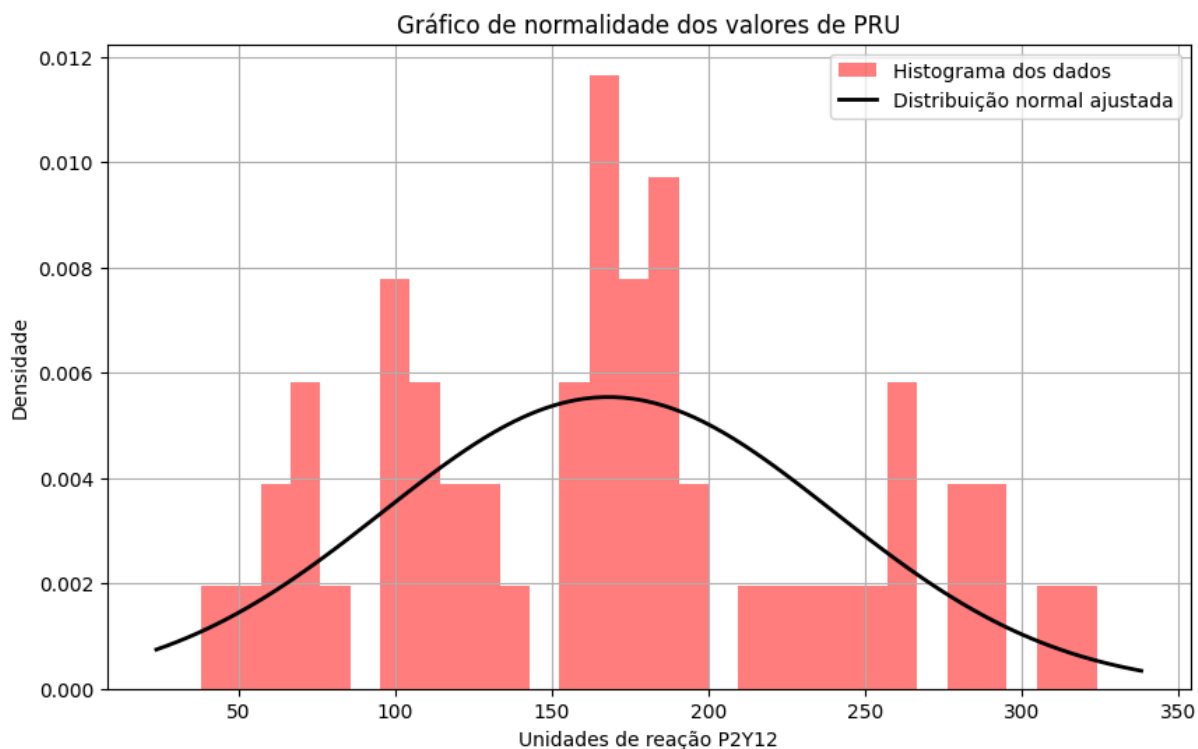


**Fonte:** Acervo próprio.

#### 5.4 VALORES DE UNIDADES DE REAÇÃO P2Y12

Dentre os indivíduos genotipados, os dados de PRU de 56 indivíduos foram analisados quanto à sua normalidade. O teste de Shapiro-Wilk resultou em um valor-p de 0.164, indicando normalidade dos dados (Figura 9). De maneira similar, o teste D'Agostino-Pearson apresentou um valor-p de 0.324, reafirmando a normalidade. A aplicação do teste Anderson-Darling em vários níveis de rigor confirmou essa conclusão, com os dados de PRU sendo considerados normais em todas as condições testadas.

**Figura 9:** Histograma dos valores de PRU (Unidades de Reação P2Y12) de 56 pacientes já genotipados, com a densidade de ocorrência no eixo vertical e os valores de PRU no eixo horizontal. A curva preta sobreposta ao histograma mostra uma Distribuição Normal Ajustada baseada na média e desvio padrão dos dados, permitindo uma comparação visual entre a distribuição observada dos valores de PRU e o que seria esperado em uma distribuição normal.



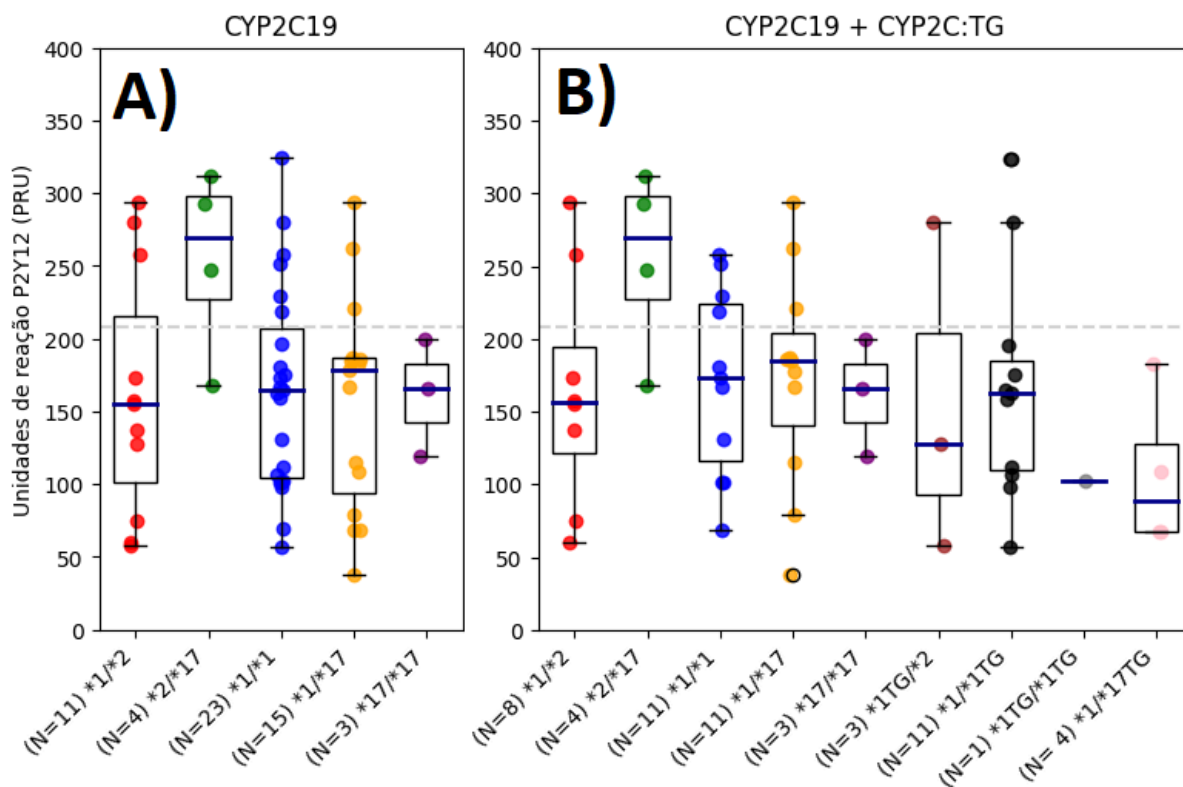
**Fonte:** Acervo próprio.

## 5.5 DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES DE REAÇÃO P2Y12 POR GRUPO

Entre os 56 indivíduos genotipados com PRU e para os alelos \*2, \*3 e \*17 do gene *CYP2C19*, a maioria pertence aos grupos '\*1/ \*1' e '\*1/ \*17', com 22 e 14 indivíduos, respectivamente. Todos os grupos possuem indivíduos com PRU acima de 208, com exceção do grupo '\*17/ \*17' que possui apenas 3 indivíduos, todos com PRU abaixo de 208 (Figura 10). Vinte pacientes apresentaram o haplótipo *CYP2C: TG*, sendo a maioria \*1/\*1TG, com 11 pacientes. Todos os grupos possuindo o haplótipo possuem médias e medianas de PRU menores do que seus respectivos grupos sem o haplótipo.

**Figura 10:** Distribuição das Unidades de reação P2Y12 (PRU) por genótipo de 56 pacientes antes e depois da genotipagem do haplótipo *CYP2C: TG*. A) Distribuição de PRU de 56 pacientes genotipados para os alelos \*2, \*3 e \*17 do gene *CYP2C19*. B) Distribuição dos mesmos 56 pacientes após a genotipagem também do haplótipo *CYP2C: TG*. Cada *boxplot* representa um grupo de diplótipo específico, indicando a mediana (linha interna), quartis (bordas da caixa) e variações interquartis (linhas verticais). Os pontos dispersos representam observações individuais, distribuídas de forma a visualizar a densidade de dados. A linha horizontal que corta o gráfico representa o eixo PRU 208, onde os indivíduos acima deste valor são considerados resistentes ao clopidogrel.





Fonte: Acervo próprio.

A frequência da variante TG em nossa população de estudo é de 14,29%. No estudo de Fernandes et al. (2023), a tribo Kaingang apresenta uma frequência de 49% e os Guarani, 46,9%. Nas populações africanas do projeto One Thousand Genomes, muitas não apresentam a variante TG (frequência de 0), com exceção dos ACB (3,64%) e ASW (9,02%). Nas populações americanas, as frequências são: CLM 34,57%, MXL 38,28%, PUR 24,04% e PEL 42,35%. Entre os europeus, as frequências variam de 15,38% (GBR) a 24,77% (TSI). Nas populações sul-asiáticas, as frequências variam de 11,27% (ITU) a 16,67% (PJL). Entre os leste-asiáticos, as frequências variam de 10,61% (KHV) a 20,19% (JPT) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Frequências alélicas da população do estudo, incluindo dados de tribos brasileiras do artigo de Fernandes et al., (2023), e nossas análises com as populações do *One Thousand Genomes* (Auton et al., 2015): Britânicos vivendo na Inglaterra e Escócia (GBR), Finlandeses (FIN), descendentes europeus vivendo em Utah (CEU), indivíduos da Toscana, Itália (TSI), ibéricos da Espanha (IBS), japoneses em Tóquio (JPT), chineses Han do Sul (CHS), chineses Han de Pequim (CHB), chineses Dai em Xishuangbanna, China (CDX), vietnamitas Kinh (KHV), indianos Gujarati em Houston, Texas (GIH), indianos Telugu vivendo na Inglaterra (ITU), tâmeis do Sri Lanka vivendo na Inglaterra (STU), indivíduos de Bengali, Bangladesh (BEB), Punjabi em Lahore, Paquistão (PJL), Mandinka na Gâmbia (GWD), Mante de Saerra (MSL), Yorubas da Nigéria (YRI), Esan da Nigéria

(ESN), Luhya no Quênia (LWK), afro-caribenhos em Barbados (ACB), afro-americanos do sudoeste dos EUA (ASW), peruanos de Lima, Peru (PEL), descendentes de mexicanos em Los Angeles (MXL), colombianos de Medellín (CLM) e porto-riquenhos (PUR).

<b>População</b>		<b>TG</b>
Brasileiros	Presente estudo (56)	0.1429
	Guarani (36)	0.469
	Kaingang (54)	0.490
Africanos	LWK	0
	ESN	0
	YRI	0
	MSL	0
	GWD	0.0044248
	ACB	0.0364583
	ASW	0.0901639
Americanos	CLM	0.3457447
	MXL	0.3828125
	PUR	0.2403846
	PEL	0.4235294
Europeus	TSI	0.2476636
	IBS	0.2122642
	GBR	0.1538462
	CEU	0.1868687
	FIN	0.2323232

Sul Asiáticos	PJL	0.1666667
	GIH	0.1650485
	ITU	0.1127451
	STU	0.1372549
	BEB	0.1337209
Leste Asiáticos	CDX	0.1935484
	KHV	0.1060606
	CHS	0.1238095
	CHB	0.2038835
	JPT	0.2019231

Quando observamos as frequências genótípicas com a junção dos alelos estrela do gene *CYP2C19* e o haplótipo, notamos que, na população do nosso estudo, os genótipos \*1CG ou TA / \*1CG ou TA e \*1CG ou TA / \*1TG são encontrados em 19,64% dos indivíduos cada. Em comparação, os Guarani apresentam uma maior frequência do genótipo \*1CG ou TA / \*1TG (39,4%), enquanto a tribo Kaingang tem uma predominância de \*1CG ou TA / \*1TG (55,6%). Estes achados destacam as variações genéticas entre as populações estudadas.

**Tabela 7:** Frequências genótípicas em três grupos populacionais: Nossa população de estudo, e as tribos brasileiras Guarani e Kaingang (Fernandes et al. 2023). Cada linha representa uma combinação específica de variantes alélicas e as colunas mostram a frequência relativa dessa combinação em cada grupo. As frequências são expressas como proporções (variando de 0 a 1), sendo 1 equivalente a 100%.

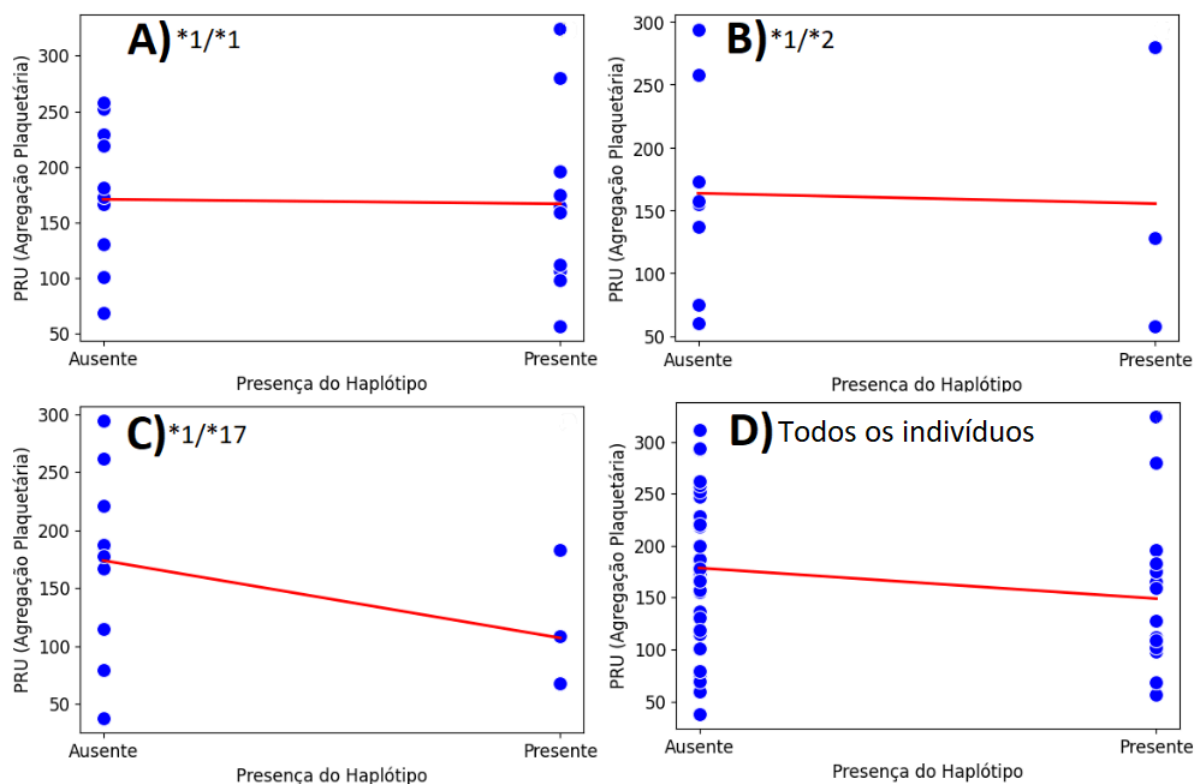
<b>CYP2C19 + CYP2C</b>	<b>Presente estudo (56)</b>	<b>Guarani (36)</b>	<b>Kaingang (54)</b>
*1CG ou TA / *1CG ou TA	0.1964285	0.182	0.241
*1CG ou TA / *1TG	0.19642857	0.394	0.556

<b>*1TG / *1TG</b>	0.01785714	0.182	0.204
*1CG ou TA / *2CG ou TA	0.14285714	0.030	0
<b>*1TG / *2CG ou TA</b>	0.05357142	0.182	0
*2CG ou TA / *17CG ou TA	0.07142857	0	0
1*CG ou TA / *17CG ou TA	0.19642857	0.030	0
<b>1*TG / *17CG ou TA</b>	0.07142857	0	0
17*CG ou TA / *17CG ou TA	0.05357142	0	0

## 5.6 ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO HAPLÓTIPO COM OS VALORES DE PRU

O haplótipo não demonstrou influenciar significativamente os valores de PRU em nenhum dos grupos comparados, porém, em todos os grupos, a média de PRU dos indivíduos com o haplótipo foram menores do que as médias dos indivíduos sem o haplótipo (Figura 11) (Tabela 8), evidenciando uma tendência estatística que pode ter sua significância prejudicada devido ao baixo número de pacientes incluídos no estudo.

**Figura 11:** A imagem contém quatro gráficos de dispersão (A, B, C, D), cada um representando a relação entre a presença do haplótipo e o nível de agregação plaquetária (PRU). Em cada gráfico, os pontos azuis indicam os valores de PRU para indivíduos com e sem o haplótipo. A linha vermelha representa a tendência linear (ajuste do modelo) dessa relação.



Fonte: Acervo próprio.

**Tabela 8:** Resultados da regressão linear simples aplicada em cada 'Grupo'. 'Coeficiente do modelo': Efeito do haplótipo. 'Intercepto do modelo': PRU quando o haplótipo está ausente. 'all': Todos os indivíduos do grupo A, B e C.

Grupo	Alelos	Coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	Coeficiente do modelo	Intercepto do modelo	Teste t Valor-p
A	*1/*1	0.0009	-4.0909	171	0.895
B	*1/2	0.0021	-8.2917	163	0.915
C	*1/*17	0.1684	-66.8182	173	0.097
D	all	0.0358	-29.5149	178	0.177

## 6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a genotipagem do gene *CYP2C19* em 146 indivíduos revelou uma frequência do alelo \*17, que confere uma maior expressão enzimática e conseqüentemente uma maior velocidade de metabolização, muito semelhante àquela reportada por

Rodrigues-Soares et al. (2018) na população brasileira, com 21% em nosso estudo e 19% no estudo de Rodrigues-Soares et al. (2018) (Tabela 8).

**Tabela 9:** Frequência das variantes genóticas do gene *CYP2C19* da nossa população de estudo comparada com os dados de Rodrigues-Soares et al. (2018).

<b>POPULAÇÃO BRASILEIRA</b>	<b>Presente estudo</b>	<b>Rodrigues-Soares, et al. (2018).</b>
<i>CYP2C19</i> *2	0.13	0.14
<i>CYP2C19</i> *3	0	0
<i>CYP2C19</i> *17	0.21	0.19

Contudo, observamos variações nos valores de PRU entre os indivíduos genotipados para o gene *CYP2C19*, incluindo homozigotos e heterozigotos para o alelo \*17. Essas variações abrangeram desde uma boa resposta ao clopidogrel, com PRUs entre 40 e 180, até casos de resistência ao tratamento, com PRUs superiores a 208. Estudos de fenótipos metabólicos, medidos por cromatografia líquida e analisando o índice metabólico entre fármaco/metabólito em populações da América Latina, sugerem que o genótipo inferido por alelos estrela pode não corresponder à atividade enzimática prevista pelos scores de atividade propostos pela CPIC (de Andrés et al., 2016, 2017 e 2020 ). Isso indica que tais testes devem ser validados nessas populações, incluindo a brasileira, antes de serem implementados na rotina clínica.

A discordância entre os fenótipos metabólicos do gene *CYP2C19* previstos genotipicamente e aqueles determinados por análises farmacocinéticas justificou a pesquisa realizada por Fernandes et al. (2023), uma parceria entre o Instituto Nacional de Câncer e a Universidade Estadual de Maringá. O estudo investigou a frequência do haplótipo *CYP2C: TG* em dados de indivíduos indígenas americanos presentes nos bancos de dados *One Thousand Genomes* e *Human Genome Diversity Project*, além de também investigar a frequência desse haplótipo nas populações indígenas brasileiras Kaingang e Guarani, utilizando PCR em tempo real por ensaios *TaqMan*<sup>™</sup> para discriminação alélica. Ao comparar a frequência do haplótipo dessas populações com a de outras populações do *One Thousand Genomes*, como europeia, africana e asiática, observou-se que as populações do estudo apresentavam uma frequência significativamente maior (teste do qui-quadrado,  $p < 0.0001$ ) em relação aos outros grupos. Este resultado reforça a possível relação do haplótipo com as discordâncias

entre o fenótipo predito e o fenótipo real em indivíduos nativo-americanos e miscigenados, como a população brasileira.

Um artigo de Zubiaur e Gaedigk (2022) corrobora os resultados apresentados em nosso trabalho: o gene *CYP2C18*, no qual o haplótipo investigado está presente, tem sido negligenciado em estudos farmacogenéticos ao longo dos anos. Considerando as pesquisas recentes, é necessário incluir o estudo deste gene nas investigações farmacogenéticas, especialmente com foco no haplótipo *CYP2C:TG*. O estudo de Zubiaur e Gaedigk argumenta que as diretrizes atuais da CPIC (2024) podem não abordar suficientemente certos aspectos importantes relacionados a este gene.

Além disso, o alelo \*17 do gene *CYP2C19* é reconhecido por caracterizar metabolizadores rápidos e ultrarrápidos de vários medicamentos, incluindo o escitalopram. No estudo de Bråten et al. (2021) com noruegueses, observou-se que indivíduos portadores do alelo \*17 apresentam metabolização rápida quando heterozigotos e metabolização ultrarrápida quando homozigotos, conforme corroborado pelas diretrizes da CPIC. Essas diretrizes são precisas para a população europeia, mas podem não ser totalmente aplicáveis a populações nativas americanas e miscigenadas, como a brasileira. Neste mesmo estudo o haplótipo *CYP2C:TG* também foi investigado, e foi notado uma associação da sua presença a uma metabolização acelerada do escitalopram. Já na pesquisa de Zubiaur et al. (2023), utilizando medicamentos como citalopram, sertralina, voriconazol, omeprazol, pantoprazol e rabeprazol, concluiu que o haplótipo não mostrou influenciar a metabolização na população estudada, que era predominantemente europeia.

O oposto também pode ocorrer, mesmo em populações europeias. No estudo de Kee et al. (2022), o haplótipo quando homozigoto foi significativamente associado ( $p = 0.03$ ) à rápida metabolização e consequente falha de tratamento em pacientes com refluxo gastroesofágico tratados com omeprazol, algo que não foi observado em indivíduos com o alelo \*17. Este trabalho é um exemplo adicional de que conclusões sobre o haplótipo e as variantes com importância farmacogenética no gene *CYP2C19* devem considerar a ancestralidade, o medicamento específico e a condição do indivíduo (se estão doentes ou não). Generalizações não são adequadas, pois, embora ambos os estudos tenham investigado a influência do haplótipo na metabolização do omeprazol, chegaram a conclusões opostas. No entanto, o artigo de Kee et al. (2022) lidou exclusivamente com uma população doente em tratamento, diferente da população estudada por Zubiaur et al. (2023).

Duconge et al. (2021) utilizaram uma metodologia semelhante à aplicada em nosso trabalho, associando valores de PRU obtidos através do agregômetro VerifyNow com os genótipos do gene *CYP2C19*. Na pesquisa de Duconge et al., foi identificado que, através dos resultados de PRU, 33,5% dos 474 pacientes hispânicos do Caribe genotipados exibiam resistência ao clopidogrel (PRU>208). Dentro do grupo de resistentes, cerca de 7% possuíam o alelo \*2, associado com uma atividade nula da enzima *CYP2C19* e conseqüentemente menor velocidade de ativação do clopidogrel. Esse resultado é comparável aos nossos achados, onde a quantidade de pacientes com o alelo \*2 representa uma pequena parte do total de pacientes com resistência ao medicamento. Nesse grupo de 7%, os heterozigotos com o alelo \*2 apresentavam um aumento de PRU de 40,5 unidades, enquanto os homozigotos para o alelo \*2 mostravam um aumento de PRU de 89,3 unidades. O estudo de Duconge et al. é o primeiro realizado na América Latina associando essas variáveis. Os autores utilizaram a tecnologia *Illumina BeadArray Chip* para investigar mais de um milhão de SNPs e evidenciaram uma significância ( $p < 0.001$ ) na associação do alelo \*2 com o aumento de PRU, além de associarem diversas outras variantes aos valores de PRU, porém os SNPs relacionados ao haplótipo *CYP2C:TG* não foram incluídos na investigação. Os autores discutem o fato de haver pacientes resistentes ao clopidogrel que não são categorizados como metabolizadores lentos ou intermediários pelo fenótipo predito, sugerindo a existência de outras possíveis influências sobre os valores de PRU.

Quanto à influência do haplótipo *CYP2C:TG* na metabolização do clopidogrel, há apenas um artigo na literatura até o momento, de Ganoci et al. (2024), que divulga dados de 283 pacientes europeus de descendência eslava que fazem parte de um projeto ainda maior, chamado *Pharmacogenomics in Prediction of Cardiovascular Drugs Adverse Reactions*, que possui foco na investigação de características genéticas na metabolização de medicamentos cardiovasculares, com o objetivo de incluírem 1200 pacientes. O artigo discute a influência do haplótipo na predisposição a novos quadros trombóticos nesses pacientes e concluiu que não há relação estatisticamente significativa entre o haplótipo e a predisposição a um maior ou menor número de quadros trombóticos até então. Este artigo não deve comprometer a importância de se estudar o haplótipo, pois trata-se de um estudo com baixa diversidade étnica e que não utilizou dados laboratoriais quantitativos sobre a eficácia do medicamento, apenas dados de prontuários.

As distribuições nos valores de PRU na nossa população indicam uma possível incoerência entre o fenótipo predito e o metabólico, o que é corroborado por muitos estudos que lidam com populações latinas. Apesar de nossos resultados de associação não mostrarem significância estatística, ao compararmos as médias entre os grupos com e sem haplótipo,



notamos que, em todos os grupos com o haplótipo, suas médias são menores em comparação aos mesmos grupos sem o haplótipo equivalente, independentemente dos seus alelos no gene *CYP2C19*. Essa conclusão se torna possível pois todas as regressões tiveram como resultado um coeficiente de modelo negativo, indicando que quando a média de X aumenta de 0 para 1, ou seja, quando um indivíduo possui o haplótipo, a média do eixo Y diminui, que representa a média de PRU. Portanto a média de PRU do eixo 0 (pacientes sem o haplótipo) foi maior em todas as regressões aplicadas (Tabela 8). Embora o tamanho de amostra (N) seja pequeno, o que pode explicar a ausência de significância estatística, os indivíduos com o alelo \*17 e o haplótipo apresentam os menores valores de média e mediana de PRU do estudo, quando observados apenas os grupos com o haplótipo. Isso sugere um possível aumento da atividade da enzima *CYP2C19*, que, segundo as diretrizes da CPIC, já seria aumentada pela presença do alelo \*17 por si só. No entanto, quando esses indivíduos \*17 possuem o haplótipo, os valores de PRU se tornam ainda menores.

É interessante ressaltar que, graças à análise de fase aplicada aos nossos dados genéticos, foi possível determinar, com uma precisão próxima de 100%, em qual cromossomo o haplótipo se encontrava. Ressalta-se que não há nenhum indivíduo em que o haplótipo esteja em um cromossomo que possua alguma das variantes do gene *CYP2C19*, permanecendo assim o *CYP2C:TG* exclusivamente junto ao alelo \*1. Esse fato ocorre de forma idêntica nos estudos incluídos nesta discussão que também lidam com a genotipagem do haplótipo, como o estudo de Fernandes et al. (2023), Braten et al. (2021) e Zubiaur et al. (2023).

Foram investigados os dados clínicos dos três pacientes que apresentam o haplótipo e demonstraram valores de PRU muito altos (>280), considerados *outliers* na Figura 10. Dois desses indivíduos possuem diabetes, embora o tipo não tenha sido especificado. Todos eles também são hipertensos, uma característica comum na maioria da população do estudo. Esses pacientes fazem uso de outros medicamentos concomitantemente, como dimalato de magnésio, ácido acetilsalicílico, carvedilol, rosuvastatina, e gliclazida. No entanto, é comum que outros pacientes com valores de PRU mais baixos também usem esses medicamentos simultaneamente. Portanto, até o momento não encontramos características clínicas peculiares que expliquem os valores mais altos de PRU desses pacientes em comparação ao restante da população do estudo.

Conseqüentemente, os resultados desta pesquisa e a literatura correspondente apontam para uma lacuna nas diretrizes de prescrição baseadas apenas em genótipos comuns do gene *CYP2C19*. A incorporação de uma análise mais detalhada de haplótipos, como

sugerido pelos estudos de Fernandes et al. (2023) e Zubiatur (2022), poderia aprimorar a precisão da terapia com clopidogrel, especialmente em populações com alta diversidade genética como a brasileira.

## **7 CONCLUSÃO**

Nossos resultados não mostraram uma associação significativa entre a presença do haplótipo *CYP2C:TG* e os valores de PRU. No entanto, ao observarmos as médias e medianas, notamos uma tendência de que o haplótipo predisponha a menores valores de PRU. Comparando nossos resultados com a literatura e os dados públicos do projeto *One Thousand Genomes*, encontramos similaridades nas frequências genotípicas e alélicas com os estudos envolvendo populações brasileiras, exceto aqueles que incluíram populações de tribos nativas brasileiras, que apresentaram uma frequência maior do haplótipo em relação ao nosso estudo. Além disso, concluímos que o fenótipo predito com base exclusivamente nos alelos estrela do gene *CYP2C19* pode não ser preciso para a nossa população.

## REFERÊNCIAS

AIZAWA, T. et al. Time-dependent changes in P2Y12 reaction unit values for predicting the different types of cardiovascular events in patients with ischemic heart disease. **Heart and Vessels**, v. 38, p. 1218-1227, 15 jun. 2023.

AUTON, Adam; BROOKS, Lisa D.; DURBIN, Richard M.; GARRISON, Erik P.; KANG, Hyun Min; KORBEL, Jan O.; MARCHINI, Jonathan L.; McCARTHY, Shane; McVEAN, Gil A.; ABECASIS, Gonçalo R. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, p. 68-74, 1 out. 2015. DOI: 10.1038/nature15393

DE ANDRÉS, Fernando et al. Relationships between CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 metabolic phenotypes and genotypes in a Nicaraguan Mestizo population. **Pharmacogenomics J**, v. 21, n. 2, p. 140-151, abr. 2021. Epub 6 out. 2020. DOI: 10.1038/s41397-020-00190-9.

DE ANDRÉS, Fernando et al. To Genotype or Phenotype for Personalized Medicine? CYP450 Drug Metabolizing Enzyme Genotype-Phenotype Concordance and Discordance in the Ecuadorian Population. **OMICS**. Dec;20(12):699-710. 2016. doi: 10.1089/omi.2016.0148.

DE ANDRÉS, Fernando et al. CYP450 Genotype/Phenotype Concordance in Mexican Amerindian Indigenous Populations-Where to from Here for Global Precision Medicine? **OMICS**. Sep;21(9):509-519. 2017. doi: 10.1089/omi.2017.0101.

CAPRIE STEERING COMMITTEE. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). **Lancet**, [S.I.], v. 348, n. 9038, Nov. 1996. DOI: 10.1016/s0140-6736(96)09457-3.

CHRISTOPHERSON, Pete W.; BOUDREAUX, Mary K. **Platelet Signal Transduction and Activation Response**. In: BROOKS, Marjory B. et al. (Eds.). Schalm's Veterinary Hematology, 7. ed. [S.I.]: [s.n.], 2022. cap. 77. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119500537.ch77>.

CONSEJO INTERTERRITORIAL DEL SISTEMA NACIONAL DE SALUD DE ESPAÑA (CISNS). **Acuerdo Sobre el Catálogo de Pruebas Genéticas de la Cartera Común de Servicios del Sistema Nacional de Salud**. Acuerdo. nº: 1553. Acta nº: 273. 2023.

DEAN, Laura; KANE, Megan; PRATT, Victoria M.; SCOTT, Stuart A.; PIRMOHAMED, Munir; ESQUIVEL, Bernard; KATTMAN, Brandi L.; MALHEIRO, Adriana J., editores. Clopidogrel Therapy and CYP2C19 Genotype. In: **Medical Genetics Summaries [Internet]**. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. Publicado em 8 mar. 2012. Atualizado em 1 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84114/>. PMID: 28520346.

DUCONGE, Jorge et al. Pharmacogenomic polygenic risk score for clopidogrel responsiveness among Caribbean Hispanics: A candidate gene approach. **Clinical and Translational Science**, v. 2021. DOI: 10.1111/cts.13124. Publicado em 14 julho 2021.

ERDOGAN, Emrah; BAJAJ, Retesh; LANSKY, Alexandra; MATHUR, Anthony; BAUMBACH, Andreas; BOURANTAS, Christos V. Intravascular Imaging for Guiding In-Stent Restenosis and Stent Thrombosis Therapy. **Journal of the American Heart Association**, v. 11, e026492, 3 nov. 2022. DOI: 10.1161/JAHA.122.026492.

FERNANDES, Vanessa Câmara et al. Distribution of a novel CYP2C haplotype in Native American populations. **Front Genet**, v. 14, art. 1114742, mar. 2023. eCollection 2023. DOI: 10.3389/fgene.2023.1114742.

FRICKE-GALINDO et al. Interethnic variation of CYP2C19 alleles, 'predicted' phenotypes and 'measured' metabolic phenotypes across world populations. **Pharmacogenomics Journal**, 16(2), 113-123. 2015.

GANOČI, Lana; PALIĆ, Jozefina; TRKULJA, Vladimir; STARČEVIĆ, Katarina; ŠIMIČEVIĆ, Livija; BOŽINA, Nada; LOVRIĆ-BENČIĆ, Martina; POLJAKOVIĆ, Zdravka; BOŽINA, Tamara. Is CYP2C Haplotype Relevant for Efficacy and Bleeding Risk in Clopidogrel-Treated Patients? **Genes**, v. 15, n. 5, p. 607, 10 maio 2024. DOI: 10.3390/genes15050607.

HASANAH, K. U.; HASMONO, D.; SUMADI, F. A. Use of Clopidogrel in Ischemic Stroke Patients. **KnE Medicine**, v. 2, n. 3, p. 621-629, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.18502/kme.v2i3.11916>.

INGELMAN-SUNDBERG, Magnus et al. What is the Current Clinical Impact of the CYP2CTG Haplotype? **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 183, fev. 2024. DOI: 10.1002/cpt.3094.

ISKANDAR, Nicholas P.; REDDY, Akshay J.; DANG, Allen; GHOURI, Muhammad S.; MIN, Mildred; BACHIR, Mark; BACHIR, Alex; WAGH, Himanshu; TAK, Nathaniel; BRAHMBHATT, Hetal. An Examination of Clopidogrel in the Treatment of Coronary Microvascular Disease. **Cureus**, v. 14, n. 8, e28406, 25 ago. 2022. DOI: 10.7759/cureus.28406.

JAMES, G., WITTEN, D., HASTIE, T., e TIBSHIRANI, R. (2013). **An introduction to statistical learning: with applications in R**. 1st ed. 2013, Corr. 7th printing 2017. Springer.

KAMBHAMPATI, N. T. et al. Cytochrome P450 2C19 Polymorphisms and Its Association With Major Adverse Cardiac Events in Post-coronary Intervention Patients on Clopidogrel in the Tertiary Care Center. **Cureus**, v. 15, n. 2, February 07, 2023. doi:10.7759/cureus.34737.

KEE, Ping Siu; MAGGO, Simran D. S.; KENNEDY, Martin A.; BARCLAY, Murray L.; MILLER, Allison L.; LEHNERT, Klaus; CURTIS, Maurice A.; FAULL, Richard L. M.; PARKER, Remai; CHIN, Paul K. L. Omeprazole Treatment Failure in Gastroesophageal Reflux Disease and Genetic Variation at the CYP2C Locus. **Frontiers in Genetics**, [s.l.], v. 13, p. 1-10, 2022. DOI: 10.3389/fgene.2022.869160. PMID: 35664313; PMCID: PMC9160307.

KUSZYNSKI, D.S.; LAUVER, D.A. Pleiotropic effects of clopidogrel. **Purinergic Signalling**, v. 18, p. 253-265, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11302-022-09876-0>.

LEE, Craig R. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2022 Update. **Clin Pharmacol Ther**, v. 112, n. 5, p. 959-967, nov. 2022. Epub 8 fev. 2022. DOI: 10.1002/cpt.2526.

NOVROSKI, N. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): Ancestry-, phenotype-, and identity-informative SNPs. In: **Forensic Genetic Approaches for Identification of Human Skeletal Remains**. 2023. p. 247-270. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815766-4.00012-1>.

OLIE, Renske H. et al. Differential Impact of Cytochrome 2C19 Allelic Variants on Three Different Platelet Function Tests in Clopidogrel-Treated Patients. **J. Clin. Med.**, v. 10, n. 17, p. 3992, 2021. <https://doi.org/10.3390/jcm10173992>.

OSSOLA, P.; CIAMPI, C.; GRIECO, N.; DI MATTEO, I.; EMANUELA, P.; GIANNATTASIO, C.; OLIVA, F. Genetic resistance to clopidogrel and complex PCI: A case report. **European Heart Journal Supplements**, v. 25, Suppl\_D, p. D165-D166, maio 2023. DOI: 10.1093/eurheartjsupp/suad111.388. Publicado em 18 maio 2023.

PINHEIRO e JARDIM. Mortalidade por Doença Isquêmica do Coração no Brasil – Disparidades no Nordeste. **Arq. Bras. Cardiol**. 117(1): 61-62. 2021.

RODRIGUES-SOARES, Fernanda et al. Genetic structure of pharmacogenetic biomarkers in Brazil inferred from a systematic review and population-based cohorts: a RIBEF/EPIGEN-Brazil initiative. **Pharmacogenomics J**, v. 18, n. 6, p. 749-759, dez. 2018. DOI: 10.1038/s41397-018-0015-7. Publicado online em 1 maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41397-018-0015-7>.

SAMMARTINO, A. et al. Platelet reactivity in elderly patients with acute coronary syndrome and atrial fibrillation. **European Heart Journal Supplements**, v. 25, Suppl\_D, p. D119-D120, maio 2023. <https://doi.org/10.1093/eurheartjsupp/suad111.286>.

SCUDELER, M. M.; SOARES, F. R. . Farmacogenética na América Latina. **Acta Biologica Brasiliensia**, v. 3, p. 85-100, 2020.

SHAO, Jing; CHEN, Wenqiang. Mitigating effect of clopidogrel and systematic management on adverse events after interventional therapy for coronary heart disease. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 387-392, fev. 2022. ISSN: 1596-5996 (print); 1596-9827 (electronic). Disponível em: <http://www.tjpr.org>. DOI: 10.4314/tjpr.v21i2.23.

TODO, Marcia Cristina; BERGAMASCO, Carolina Marabesi; AZEVEDO, Paula Schmidt; MINICUCCI, Marcos Ferreira; INOUE, Roberto Minoru Tanni; OKOSHI, Marina Politi; PAIVA, Sergio Rupp de; ZORNOFF, Leonardo Mamede; POLEGATO, Bertha Furlan. Impact of coronary intensive care unit in treatment of myocardial infarction. **Rev Assoc Med Bras** (1992), v. 63, n. 3, p. 242-247, mar. 2017. DOI: 10.1590/1806-9282.63.03.242.

VRANCKX, Pascal. Development of myocardial infarction. **Cardiovascular Medicine** In: MED. 2018. p. 1230-1232. DOI: 10.1093/MED/9780198784906.003.0309\_UPDATE\_001.

WALSH, R.; JURGENS, S. J.; ERDMANN, J.; BEZZINA, C. R. Genome-wide association studies of cardiovascular disease. **Physiological Reviews**, [S.l.], v. 103, n. 3, p. 2039-2055, 1 jul. 2023. DOI: 10.1152/physrev.00024.2022. Publicado em 12 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> Acesso em: 09 de março de 2024.

ZUBIAUR, P.; GAEDIGK, A. CYP2C18: the orphan in the CYP2C family. **Pharmacogenomics**, v. 23, n. 17, Editorial. Publicado online em 4 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/pgs-2022-0142>.

ZUBIAUR, Pablo et al. Impact of CYP2C: TG Haplotype on CYP2C19 Substrates Clearance In Vivo, Protein Content, and In Vitro Activity. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 5, p. 1033-1042, nov. 2023. DOI: 10.1002/cpt.3012. Publicado em 11 agosto 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpt.3012>.