



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PERFIL MOLECULAR EM GENES CYP3A4 E CYP2J2:  
UM CAMINHO PARA A FARMACOGENÉTICA DO RIVAROXABAN EM  
UMA POPULAÇÃO DO NORTE DO BRASIL**

**DISCENTE:** PAULO MARTINS TOSCANO  
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro  
dos Santos

BELÉM – PA  
2014

PAULO  
MARTINS  
TOSCANO

**PERFIL MOLECULAR EM GENES CYP3A4 E CYP2J2:**  
UM CAMINHO PARA A FARMACOGENÉTICA DO RIVAROXABAN EM  
UMA POPULAÇÃO DO NORTE DO BRASIL

PPGOCM  
NPO/UFPA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PERFIL MOLECULAR EM GENES CYP3A4 E CYP2J2:  
UM CAMINHO PARA A FARMACOGENÉTICA DO RIVAROXABAN EM  
UMA POPULAÇÃO DO NORTE DO BRASIL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação  
Serviço de Documentação do Núcleo de Pesquisa  
em Oncologia e Ciências Médicas  
Universidade Federal do Pará

Toscano, Paulo Martins.

Perfil molecular em genes *cyp3a4* e *cyp2j2*: um caminho para a farmacogenética do Rivaroxaban em uma população do norte do Brasil / Paulo Martins Toscano – 2014 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2014. Orientador Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos.

1. Farmacogenética 2. Polimorfismo (genética) 3. Trombo embolismo – profilaxia.  
4. Assumpção, Paulo Pimentel orient. 5. Santos, Ney Pereira Carneiro dos, oriente.  
I. Título.

CDD 23.ed. – 615.718

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Paulo Martins Toscano  
Perfil Molecular em Genes CyP3a4 E CyP2j2:  
Um caminho para a farmacogenética do Rivaroxaban em  
uma população do norte do Brasil

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em  
Oncologia e Ciências Médicas da UFPa como requisito par-  
cial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

a Thaïs, Rafael e Lucas, que são  
tudo para mim

Aos meus pais, comigo em todos os  
momentos

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida

À minha esposa Thaís, pelo amor e companheirismo, sem os quais tudo sempre teria sido tão mais difícil

Aos meus filhos Rafael e Lucas, fontes de inspiração permanentes

Aos meus pais, Paulo e Linda, pelo apoio constante, pela amizade e pelos ensinamentos de uma vida

Aos meus irmãos, Mônica e Silvio, pela amizade e apoio em todos os momentos

Ao meu orientador, Prof. Ney Santos, pelos ensinamentos e toda a indispensável orientação, sem os quais essa pesquisa não teria sido possível

Ao Prof. Paulo Assumpção, pelo apoio e pelo exemplo de genuína liderança, que agrega e que, também, compartilha

À Laís Zumero, minha sogra, por todo o apoio e carinho, o meu muito obrigado

Ao amigo Ezequiel Noronha, pela talentosa contribuição na editoração do texto

Ao Prof. Jorge Resque, pelo apoio e amizade

À Prof. Graça Pena pela acurada normalização e imprescindível colaboração na finalização deste trabalho.

*“ Somos mais pais do nosso futuro  
do que filhos do nosso passado”*

*Miguel de Unamuno y Jugo*



## RESUMO

Nos últimos anos, novos anticoagulantes têm sido desenvolvidos com o objetivo de minimizar as dificuldades encontradas no manejo clínico das drogas convencionais, porém não existem dados publicados sobre a sua farmacogenética. Diante da hipótese de que os polimorfismos relacionados à sua metabolização possam ser fonte de variabilidade genética, o presente estudo objetiva realizar inferências de epidemiologia molecular dos polimorfismos nos genes CyP3a4 (rs2246709) e CyP2j2 (rs890293), relacionados ao metabolismo do Rivaroxaban, um novo inibidor direto do fator Xa. São analisadas 136 amostras de indivíduos saudáveis de uma população do Norte do Brasil que apresenta um elevado grau de mistura interétnica. Para alcançar o objetivo farmacogenético foi realizada, em paralelo, análise de ancestralidade genômica nos indivíduos investigados. Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os genótipos do CyP3a4 observados no estudo, quando comparados a todas as populações ancestrais para o polimorfismo 99365719 A>G ( $P < 0,05$ ). a população miscigenada do norte do Brasil, portanto, apresentou diferença na distribuição das frequências genotípicas em relação aos grupos ancestrais, formadores de nossa população. O mesmo achado não é observado para polimorfismo do gene do CyP2j2. Destaca-se que o polimorfismo no gene do CyP3a4, na amostra investigada, sofre influência da contribuição étnica europeia individual. Considerando, a elevada miscigenação que caracteriza a população local e o avanço da Farmacogenômica na medicina atual, os dados podem contribuir para a melhor compreensão da farmacogenética do novo anticoagulante.

Palavras-chave: polimorfismos, Rivaroxaban, CyP3a4, CyP2j2 e ancestralidade.

## ABSTRACT

In recent years, new anticoagulants have been developed with the purpose of minimizing the difficulties encountered in the clinical management of conventional drugs, but there are no published data on its pharmacogenetics. Considering the hypothesis that polymorphisms related to its metabolism may be the source of genetic variability,

lity, this study aims to make inferences on molecular epidemiology of polymorphisms in CyP3a4 (rs2246709) and CyP2j2 (rs890293) genes related to the metabolism of Rivaroxaban, a new direct factor Xa inhibitor. 136 samples from healthy individuals in a population of northern Brazil with a high degree of inter-ethnic mix, so as to guarantee that the pharmacogenetic goal was achieved, have been subjected to a parallel analysis of genomic ancestry for the individuals investigated. The results showed significant differences among genotypes for CyP3a4 observed in the study compared to all ancestral populations for a polymorphism 99,365,719 a> G (  $P < 0.05$ ). The mixed population of northern Brazil, therefore, showed differences in the distribution of genotype frequencies in relation to ancestral groups, forming our population. The same finding was not observed for the CyP2j2 gene polymorphism. It is noteworthy that the polymorphism in the CyP3a4 gene in the investigated sample is influenced by individual ethnic European contribution. Considering the high miscegenation featuring local people, and the advancement of Pharmacogenomics in current medicine, such data can contribute to a better understanding of the pharmacogenetics of that new anticoagulant.

Keywords: polymorphisms, Rivaroxaban, CyP3a4, CyP2j2, ancestry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular do Rivaroxaban	18
Figura 2	CyP3a4	23
Figura 3	Via de metabolização da Warfarina.	29
Figura 4	Cascata da coagulação e o alvo dos novos coagulantes	31
Figura 5	Metabolização e vias de eliminação do Rivaroxaban baseadas em estudos in vitro e em ensaios clínicos.	35
Figura 6	Vias intrínseca e extrínseca de ativação dos mecanismos da coagulação. A partir da ativação do fator X, inicia-se a via comum, que finaliza com a formação da malha de fibrina insolúvel.	37
Figura 7	Distribuição de frequência do CyP3a4(rs2246709) de acordo com a ancestralidade europeia.	55
Figura 8	Distribuição de frequência do CyP3a4(rs2246709) de acordo com a ancestralidade ameríndia.	55
Figura 9	Distribuição de frequência do CyP3a4(rs2246709) de acordo com a ancestralidade africana.	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limitation of current anticoagulants	17
Tabela 2 – Perfil molecular dos genes CyP3a4 e CyP252 em nossa amostra	51
Tabela 3 – Comparação das frequências genotípicas do CyP3a4 99365719a>G (rs 2246709) entre nossa amostra e das populações ancestrais	52
Tabela 4 – Comparação das frequências genotípicas do CyP2j2 – 76 G>T (rs 890293) entre nossas amostras e das populações ancestrais	53
Tabela 5 – Comparação do perfil de ancestralidade da amostra estudada	54

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Aspectos históricos dos anticoagulantes orais	15
1.2 Fatores que influenciam em sua eficácia	18
1.3 Aspectos genéticos	21
1.3.1 ASPECTOS GERAIS DA FARMACOGENÉTICA APLICADOS AOS ANTICOAGULANTES	21
1.3.2 ASPECTOS Da FARMACOGENÉTICA RELACIONADOS AO RIVAROXABAN	22
1.3.3 POLIMORFISMOS RELACIONADOS AOS ANTICOAGULANTES TRADICIONAIS	26
1.4 O Rivaroxaban	30
1.4.1 PERFIL FARMACODINÂMICO PRÉ-CLÍNICO	32
1.4.2 PERFIL FARMACODINÂMICO EM ENSAIOS CLÍNICOS	33
1.4.3 PERFIL FARMACOCINÉTICO E RELEVÂNCIA CLÍNICA	34
1.5 Bases da coagulação	36
1.5.1 O PAPEL DAS PLAQUETAS	37
1.5.2 A VIA INTRÍNSECA	39
1.5.3 A VIA EXTRÍNSECA	39
1.5.4 A VIA COMUM	39
2. JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE DO ESTUDO	40
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43

4.CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
4.1. Tipo de estudo	43
4.2. Amostra	44
4.3. Processo de seleção	44
4.4. Critério de inclusão	44
4.5. Critério de exclusão	44
4.6. Análise de risco e benefício	44
4.6.1 RISCOS	44
4.6.2 BENEFÍCIOS	44
4.7. Procedimentos	45
4.7.1. COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL	45
4.7.2. Análise de resultados	45
4.8. Aspectos éticos	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS	62

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos históricos dos anticoagulantes orais

A observação que levou ao desenvolvimento dos primeiros anticoagulantes orais, os cumarínicos, remonta ao início do século XX. Foi em 1921, a partir da ocorrência de um surto que dizimou rebanhos bovinos inteiros, e em que havia, como parte do quadro clínico, episódios de hemorragia espontânea, que o patologista veterinário Frank Schofield associou à alteração na coagulação sanguínea ao consumo do feno estragado, onde havia um fungo, o *Melilotus officinalis*. Partindo desta observação, no ano de 1940, o químico Karl Paul Gerhardt Link e colaboradores, iniciaram as pesquisas que culminaram com a obtenção do anticoagulante Dicumarol (APOSTOLAKIS, 2009). O grupo observou que a cumarina presente no Trevo Doce (*M. officinalis*), que não tinha efeito anticoagulante algum em sua forma pura, adquirira esta propriedade graças à oxidação à 4-hidroxicumarina. a substância com potente efeito anticoagulante – 3- (2-acetil-1-fenoetil)-4-hidroxicumarina foi patenteada em 1941, para uso como raticida, com o acrônimo da instituição que possibilitou a pesquisa: Warfarin (Wisconsin Alumni Research Foundation). Fatos posteriores, relacionados à ingestão de Warfarina por humanos, acabaram levando à observação de que seus efeitos anticoagulantes eram bem tolerados, e a possibilidade do uso terapêutico da mesma passou a ser, então, considerada. Patenteada e comercializada desde o ano de 1954, a Warfarina passou a ser a terapia de eleição para anticoagulação de longo prazo (GARCIA, 2009; YOSHIDA, 2011).

Ao longo dos últimos cinquenta anos, a Warfarina sódica tem sido o anticoagulante oral mais utilizado e estudado no mundo (RACHED, 2008; GUIMARÃES, 2007; ANSELL, 2008). Há dados publicados sugerindo taxa anual de prescrição equivalente a até 1,5% da população (ANSELL, 2008). Ao longo desse período, a sua utilização tem permitido a prevenção eficaz de fenômenos tromboembólicos arteriais e venosos, o que justifica a sua definitiva incorporação ao arsenal terapêutico contemporâneo.

Contudo a grande dificuldade relacionada ao seu uso está na obtenção de um controle adequado da dose necessária para exercer o seu efeito anticoagulante de forma plena, minimizando os riscos de eventos hemorrágicos (em caso de dosagem excessiva) ou de eventos trombóticos (em caso de dosagem inadvertidamente baixa). A margem terapêutica desta droga é restrita, o que implica necessidade de seguimento rígido dos pacientes, com controle laboratorial seriado.

Aí está o dilema que se põe, quando do uso da Warfarina: ao mesmo tempo em que seu uso é imperativo, dentro das indicações já bem definidas nos Consensos, sua utilização traz riscos sérios, em grande parte relacionados à dificuldade de seu controle (ANSELL, 2008).

Os esforços iniciais na busca de novos anticoagulantes remontam à cerca de 15 anos, quando o modelo terapêutico padrão para eventos trombóticos envolvia os já mencionados cumarínicos e a heparina (CHUDZINSKI, 2008). Esta sofreu uma primeira modificação, que culminou com o surgimento da molécula fracionada, conhecida como Heparina de Baixo Peso Molecular, cujas primeiras referências de uso clínico na literatura são da década de noventa (*THE COLUMBUS INVESTIGATORS, 1997*). a partir daí, o uso desta droga foi expandido, assemelhando-se às indicações da Heparina comum. Na atualidade, tem sido a primeira escolha na maioria das situações de anticoagulação rápida e de uso parenteral (HIRSH, 2004).

Novos anticoagulantes orais têm sido desenvolvidos com o intuito de oferecer resposta aos problemas mais frequentemente relacionados aos medicamentos tradicionais, quais sejam: o risco hemorrágico; a necessidade de um controle laboratorial estrito; e a via de administração, que torne o seu uso simplificado. assim, pode-se concluir que esse anticoagulante ideal e eficaz deveria preencher os seguintes pré-requisitos: 1) ter baixo risco hemorrágico; 2) sem efeitos colaterais; 3) sem interação com outros fármacos ou alimentos; 4) ser de fácil administração; 5) dispensar controle laboratorial. (CHUDZINSKI, 2008). Os avanços observados na área de Biologia Molecular, na Química, no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e a melhor compreensão dos mecanismos de ação das proteínas da cascata de coagulação permitiram o desenvolvimento de pesquisas sobre esses novos



fármacos. A Tabela 1 explicita as limitações de diferentes grupos de anticoagulantes atualmente empregados na prática clínica.

**Tabela 1. Limitação dos anticoagulantes atuais.**

AVK	HNF	HBPM	Fondaparinux	Dabigatran
Início de ação lento	Administração parenteral	Administração parenteral	Adminitração parenteral	Administração oral
Imprevisibilidade do efeito anticoagulante e resposta do paciente	Imprevisibilidade Efeito anticoagulante devido à ligação inespecífica	Contraindicado em pacientes com insuficiência renal severa	Contraindicado em pacientes com insuficiência renal severa	Contraindicado em pacientes com insuficiência renal severa
Margem terapêutica restrita	Potencial para trombocitopenia heparino-induzida	Risco de trombocitopenia heparino-induzida		Múltiplas interações farmacológica
Múltiplas interações com fármacos e alimentos	Monitorização da coagulação com TTPA ou atividade anti-fator X			Absorção intestinal dependente do PH com baixa biodisponibilidade
Monitoração constante do RNI e ajuste de dosagem	Monitorização da contagem de plaquetas			

Abreviaturas: AVK, Antagonistas VIT K; HNF, Heparina não-fracionada; HBPM, Heparina de baixo peso molecular; RNI razão normatizada internacional; TTPA, tempo de tromboplastina parcial atividade.

Fonte. BONDARENKO, 2013

De modo geral, os novos anticoagulantes podem ser divididos em três categorias:

- Inibidores da fase inicial da coagulação;
- Inibidores da fase de propagação da coagulação;
- Inibidores da fase final da coagulação.

Na prática clínica atual, estão liberados para uso os Inibidores Indiretos do Fator Xa, que são drogas de fase inicial da cascata, representados pelos pentassacarídeos sintéticos Fondapainux e Idraparinux (HERBERT, 1998; WEITZ, 2005; BULLER, 2003); o Inibidor direto sintético do Fator Xa Rivaroxaban (Bay 59-7939), que é droga de fase de propagação da cascata de coagulação (THE EINSTEIN INVESTIGATORS, 2010) e o Inibidor de Trombina Etxilato de Dabigatran, droga que atua na fase final

da cascata de coagulação (GUSTAFSSON, 2003). O Rivaroxaban (Figura 1) é uma molécula sintética de baixo peso molecular que se liga ao Fator Xa, tanto em sua forma livre, quanto na ligada ao complexo Protrombinase (PERZBORN, 2005).

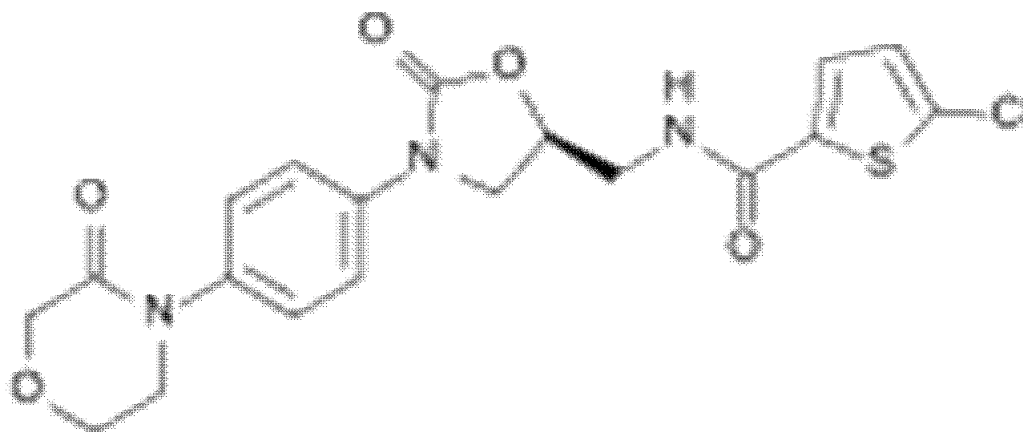


Figura 01: estrutura molecular do Rivaroxaban  
Fonte. BAYER PHARMA, 2010

## 1.2 Fatores que influenciam em sua eficácia

A efetividade dos anticoagulantes orais cumarínicos está bem estabelecida para a prevenção primária e secundária do tromboembolismo venoso, para a prevenção da embolização arterial em pacientes portadores de próteses valvares cardíacas e/ou fibrilação atrial, para a prevenção primária do infarto agudo do miocárdio - IAM em pacientes masculinos de alto risco, ou para a prevenção do acidente vascular encefálico – AVE, infarto recorrente ou morte súbita em pacientes com o IAM. Além da margem terapêutica restrita já mencionada, outros desafios relacionados ao seu uso são: alta variabilidade na resposta à droga entre os indivíduos; droga sujeita à grande interação com outros fármacos e dieta; controle laboratorial difícil de padronizar; e ajuste da dosagem dificultada pela não aderência do paciente ou problemas na comunicação médico-paciente. São aspectos que, em maior ou menor medida, afetam a sua eficácia (ANSELL, 2008).

Se considerarmos a variabilidade individual dos pacientes à droga apenas como característica inata do metabolismo de cada qual, agora melhor compreendida com o auxílio da farmacogenética, ela (a variabilidade genética) passa a figurar como um fator específico à semelhança da interação com outras drogas e da questão dietética.

Com relação à questão dietética, mesmo em populações com dieta muito pobre em vitamina K, pequenas mudanças na ingestão diária desta vitamina foram muito importantes na variabilidade diária de ação da droga, sugerindo que antigas recomendações para uma dieta com baixo teor de vitamina K poderiam ser consideradas ultrapassadas. Há dados alertando para a necessidade de se avaliar a ingestão de vitamina K como formas de suplementos multivitamínicos, o que parece ser hábito alimentar para cerca de 40% da população adulta nos EUA (LURIE, 2010). A regularidade da ingestão de vitamina K e o relato de qualquer mudança no hábito alimentar parecem ser o mais importante conselho a ser dado aos pacientes, uma vez que não há dúvida sobre o papel da vitamina K como fator que causa instabilidade, mas é passível de controle adequado. Com relação à influência da ingestão vitamínica sobre os polimorfismos CYP2C9 e VKORC1, os mecanismos de variação na resposta e o impacto da vit. K sobre o genótipo VKORC1 foram avaliados apenas em poucos estudos, havendo somente informações preliminares a respeito. Contudo, os dados sugerem haver uma maior regeneração da Vitamina K Hidroquinona nos pacientes com genótipo GG expostos à suplementação dietética, em relação aos outros tipos (SCONCE, 2008).

Com relação à interação com outras drogas, há possibilidade de potencialização ou de inibição do efeito anticoagulante, com risco de complicações hemorrágicas e/ou eventos tromboembólicos, respectivamente.

Recente revisão sistemática sobre o uso da Warfarina em população idosa, recebendo cuidados de longo prazo, expôs a dificuldade no manejo desta droga (NEIDECKER, 2012). Um aspecto levantado é que a oportunidade para a ocorrência de interações prejudiciais neste grupo de pacientes é grande, com até 89% dos pacientes ingerindo alguma droga com potencial de interagir (VERHOVSEK, 2008).

Nesse contexto, das pesquisas que culminaram com a aprovação para uso clínico do inibidor direto do Fator Xa Rivaroxaban, muitas delas avaliaram a interferência dos mesmos fatores na ação deste novo fármaco.

Pesquisadores demonstraram que a ingestão concomitante de alimentos com doses-padrão de 10mg de Rivaroxaban, via oral, não trouxe alteração nos parâmetros

farmacocinéticos, mantendo-se concentrações plasmáticas proporcionais e estáveis, além de alta biodisponibilidade. Com doses de 15 a 20mg, observou-se que para manter a biodisponibilidade em níveis superiores a 80%, foi necessária a ingestão concomitante de alimentos, uma vez que os parâmetros farmacocinéticos melhoraram com a dose, mas de forma não-proporcional, em situação de jejum (STAMPFUSS, 2013).

A interação com outros fármacos, característica que de forma marcante impacta na utilização da Warfarina, parece ser menos importante quando da utilização do Rivaroxaban. a principal recomendação é que não seja feito o uso concomitante da droga com inibidores da citocromoxidase, como os antirretrovirais utilizados no tratamento do HIV, e o Cetoconazol sistêmico e outras drogas deste mesmo grupo, considerados inibidores potentes por utilizarem a via do citocromo CYP 3 A4, e aplicando com cautela em pacientes utilizando indutores de mesma via, como por exemplo, a Rifampicina ou a Carbamazepina (THE EINSTEIN INVESTIGATORS, 2013).

Nos principais ensaios de fase III, observou-se que o uso concomitante com o Ácido Acetil Salicílico (AAS) aumentou o risco de sangramento, sem aumento estatisticamente significativo no risco de sangramentos maiores, enquanto os anti-inflamatórios não-esteroidais contribuíram para o aumento de risco geral de sangramento (DAVIDSON. et al, 2013).

Com base nas evidências supracitadas, o uso com antiagregantes plaquetários ou outras drogas que possam afetar a crase sanguínea não é contraindicado, devendo-se tomar precauções adicionais e monitoração mais rigorosa.

Não há evidências de alteração farmacocinética e/ou farmacodinâmica clinicamente relevantes quando do uso concomitante do Rivaroxaban com a Digoxina e nem com a atorvastatina, o que tem especial relevância considerando a perspectiva de uso alargado do novo anticoagulante em populações de cardiopatas, usuários frequentes de ambas as drogas. (KUBTIZA, 2012). Desde os resultados dos testes de fase I, até a análise dos dados de diferentes subgrupos nos estudos de fase III, fica confirmado que não há necessidade de ajuste da dose do Rivaroxaban de acordo com as variáveis idade, sexo ou massa corporal (ERIKSSON, 2008; ENGL, 2008; KAKKAR, 2008; TURPIE, 2009; KREUTZ, 2012).

Em contraposição às evidências já bem estabelecidas de importante variabilidade genética, relacionada a polimorfismos nos genes ligados à via de metabolização da Warfarina, não existem dados publicados sobre a farmacogenética dos novos anticoagulantes. Polimorfismos no receptor-alvo da droga seriam fontes potenciais de variabilidade genética do Rivaroxaban (CAVALLARI, 2011).

### 1.3 Aspectos genéticos

#### 1.3.1 ASPECTOS GERAIS Da FARMACOGENÉTICA APLICADOS AOS ANTICOAGULANTES

Do ponto de vista da prática clínica, há uma grande imprevisibilidade da ação anticoagulante da Warfarina. Isto ocorre devido à influência de fatores ambientais (dieta, interação farmacológica, agravos clínicos, idade e não aderência ao tratamento) já mencionados, mas também devido a fatores genéticos. Os fatores genéticos identificados com as variações da dose diária requerida de Warfarina para que esta exerça seu efeito anticoagulante nos pacientes são o polimorfismo do gene CYP2C9, as variações do haplotipo VKORC1, e o polimorfismo do gene CYP4F2, entre outros menos importantes. Estas alterações genéticas, em associação com fatores não genéticos, talvez correspondam a cerca de 50% da variabilidade na dose do anticoagulante (CARLQUIST, 2011). Considerando as dificuldades no manejo da dose, e a influência de fatores genéticos, muitos autores têm descrito a utilização de algoritmos farmacogenéticos com o objetivo de melhor estimar as dosagens necessárias de Warfarina nas diferentes populações (ANSELL, 2008; FINKELMAN, 2011; VOORA, 2012).

A elaboração desses algoritmos, levando em conta a existência de marcadores farmacogenéticos de resposta às drogas e/ou toxicidade, foi um dos benefícios derivados do sequenciamento do DNA humano no ano 2000. A partir daquele ponto, o desenvolvimento tecnológico permitiu o aperfeiçoamento de plataformas capazes de sequenciar genomas inteiros, de muitos indivíduos, em fração de tempo muito menor, com um custo reduzido. Por outro lado, a aplicação dos conceitos da Farmacogenética

à medicina cardiovascular, foi se consolidando a partir da observação da grande variabilidade de resposta a muitas drogas habitualmente utilizadas pela Cardiologia, pela Angiologia, e pela Hematologia – dentre outras – como vem a ser o caso dos anticoagulantes orais. As definições de resposta à droga são variadas, e podem incluir tanto as oscilações de testes laboratoriais (tempo de Protrombina e o cálculo do INR), quanto respostas clínicas diferentes num mesmo grupo submetido às mesmas técnicas terapêuticas (VOORA, 2012). Os conceitos da farmacogenética têm auxiliado na melhor compreensão da resposta clínica ao uso das estatinas, das tienopiridinas, da aspirina, dos diuréticos e de drogas antiarrítmicas, além da Warfarina.

### 1.3.2 ASPECTOS DA FARMACOGENÉTICA RELACIONADOS AO RIVAROXABAN

O Rivaroxaban é metabolizado pela via do citocromo P450 CYP3A4, CYP2J2 e mecanismos independentes do CYP e, *in vitro*, mostrou ser substrato da P-glicoproteína ácida e proteína de resistência do CA de mama. Portanto, drogas que afetem as vias acima expostas são passíveis de interferir na farmacocinética do Rivaroxaban (KUBITZA, 2013).

Esses genes codificam membros da superfamília de enzimas citocromo P450, que são mono-oxigenases e catalisam muitas reações envolvidas no organismo, da metabolização de aproximadamente metade dos fármacos hoje em uso, até a síntese de colesterol e outros lipídios. Uma característica marcante do CYP3A4 é que ele apresenta grande capacidade de adquirir afinidade por novos substratos, desenvolvendo uma espécie de ligação cooperativa com novas moléculas, o que acaba levando à ocorrência de interações não desejadas, facilitando a toxicidade de muitos fármacos (SEVRIOUKOVA, 2013).

Humanos apresentam 57 genes do citocromo (CYP), e 33 pseudogenes, dispostos em 18 famílias e 42 subfamílias (NERBERT, 2012). A capacidade de acomodar e metabolizar compostos de diferentes tamanhos e estrutura química, é que justifica o seu envolvimento na oxidação de mais da metade de todos os fármacos atualmente em uso (GUENGERICH, 1999).

Acelerando a sua degradação, o CYP3A4 pode diminuir a biodisponibilidade e a eficácia de uma droga ou, ao contrário, pode ocorrer de levar a um aumento nas concentrações desta, caso ocorra uma inibição do citocromo (SEVRIUKOVA, 2013). O gene do citocromo P450, Família 3, Subfamília a, Polipetídio 4 (CYP3A4) está localizado no braço longo do cromossomo 7, região 21.1. O gene do citocromo P450, Família 2, Subfamília J, Polipetídio 2 (CYP2J2) está localizado no cromossomo 1, braço curto, região 31.1 – 31.2 (Figura 02).

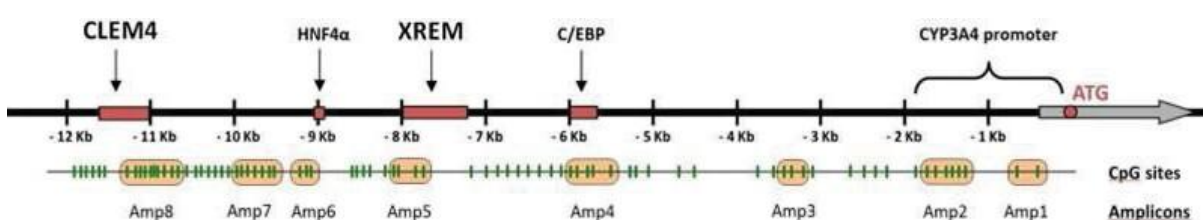


Figura 02. CyP3a4  
Fonte. NCBI-GENE ID:1576 28 de dezembro, 2013

Enquanto na farmacogenética da Warfarina os polimorfismos implicados estão relacionados às doses necessárias desta droga para inibir a regeneração de vitamina K, em sua própria via de metabolização, acarretando alterações na coagulação ou sangramento (HIGASHI et al. 2002), no caso do novo inibidor oral sintético do Fator Xa, o mecanismo que leva a um aumento da ação da droga está relacionado ao uso de fármacos que inibam a mesma via. Com base nos dados conhecidos até aqui, as enzimas referidas (CYP3A4 e CYP2J2) não teriam papel na conversão da pró-droga ou no metabolismo direto dos mesmos (os novos anticoagulantes).

Apró-droga é substrato da glicoproteína P, uma proteína polimórfica transportadora, e há evidências que a administração concomitante com substâncias que sejam inibidoras desta via possam aumentar a concentração da droga no plasma na unidade de tempo, parâmetro conhecido como curva aUC. Esta glicoproteína é codificada pelo gene ABCB1, membro da superfamília “ATP-binding cassettes transporters<sup>1</sup>”. SNPS descritos nas regiões promotoras e EXONS do gene ABCB1, têm sido relacionadas

1. Proteínas transmembrana que utilizam a energia do ATP (adenosina tri-fosfato) para facilitar processos biológicos, incluindo tradução de RNA e reparação de DNA. Transportam grande variedade de substâncias do meio intra para o extra celular, incluindo drogas.

ao aumento de sua concentração. Por suposição, variações nos genótipos de ABCB1 podem influenciar na absorção e biodisponibilidade dos novos anticoagulantes.

Além de ser substrato da glicoproteína-P, como o outro novo anticoagulante liberado para uso clínico, o Etxilato de Dabigatran, a molécula Rivaroxaban é metabolizada pelas vias do citocromo 3A4 e 2J2 que podem ser fonte de variabilidade genética, assim como os polimorfismos ABCB (KUBITZA, 2013).

Polimorfismos associados ao alelo \*22 do CYP3A4 estiveram relacionados com a redução dos níveis da proteína de expressão do mesmo, resultando em atividade diminuída das reações dependentes deste citocromo no fígado humano, e esse dado sugere haver relação entre esse polimorfismo, a menor expressão do CYP e diferenças individuais no clearance da droga (OKUBO, 2013). O CYP3A4 é responsável por muitas reações de metabolismo oxidativo de grande variedade de xenobióticos, estimando-se que possam responder por cerca de 60% de todas as drogas atualmente disponíveis.

Embora esteja claro que a expressão do CYP3A4 seja relacionada à resposta de muitas substâncias, o mecanismo ligado a essa indução – base para a interação droga/paciente – ainda não está totalmente compreendido.

Foi isolado um receptor denominado PREGNANE X (PXR, 603065), com resposta vinculada ao promotor do CYP3A4, e ativado por muitas drogas que também induzem a expressão deste citocromo (LEHMANN, 1998).

Essa evidência forneceu a explicação molecular para a habilidade de diferentes drogas induzirem o CYP3A4 e, posteriormente, deu as bases para o estudo da interação droga-homem. alterações na atividade ou na expressão do CYP3A4 parecem ser a chave preditora de resposta e toxicidade das drogas. (THUMMEL, 1998). Observaram-se que receptores nucleares de PRX e da proteína CAR (Constitutive Androstone Receptor) regulavam a expressão deste citocromo. a atividade do CYP3A4 (promotor) foi mais pronunciada em extratos de hepatócitos, e discreto ou mesmo ausente com células não-hepáticas, sugerindo a existência de um fator hepático específico, necessário a uma resposta transcripcional fisiológica.



Em 2003, foi identificado um receptor nuclear no hepatócito denominado Fator 4 alfa (HNF 4<sup>a</sup>, 600281) que era fortemente envolvido com ativação/transcrição do CYP3A4, mediada pelo PRX e pelo CAR (TIRONA, 2003).

Estudos em genética molecular evidenciaram a presença de mecanismos de proteção ativados durante reações de metabolização de diversas drogas, envolvendo o citocromo P450. Reações de metabolismo de fase I do citocromo P450 produzem muitos componentes intermediários, que podem provocar danos ao DNA nativo. Enzimas como a Glutathione-S-Transferase (GSTP1, 134660) e as N-acetil Transferases (NAT1, 108345), que são enzimas de fase II, inativam vários componentes tóxicos, numa espécie de mecanismo de autorregulação. Como exemplo, cita-se o polimorfismo do CYP2D6, que foi associado ao risco aumentado de leucemia, devido a uma incapacidade em inativar carcinógenos químicos.

Outro exemplo de polimorfismo do P450, neste caso do CYP3A4, que interfere no metabolismo de drogas, é o da variação genética ligada ao risco potencial de leucemias induzido por inibidores da DNA Topoisomerase II (FELIX, 1998). Ficou demonstrado que pacientes previamente tratados desta enfermidade, e já expostos ao contato com uma ou mais drogas quimioterápicas metabolizadas pela via do CYP3A, portadores do polimorfismo relacionado – CYP3A4 V (124010.0001) – apresentaram risco aumentado em relação aos não-portadores.

Estudos de associação genótipo/haplótipo envolvendo 1117 irmãos com Ca de próstata detectaram a correlação entre a maior agressividade ou risco deste tipo de neoplasia e o número de polimorfismos do CYP3A4 e o CYP3A4 haplotipo (LOUKOLA, 2004).

O CYP2J2 é composto por nove exons e oito introns, e apresenta a mesma característica de maleabilidade estrutural de todos os CYPs. Quatro sítios de ligação relacionados ao fator de transcrição SP1 são encontrados no promotor selvagem do gene CYP2J2. Ele é expressado em altos níveis no coração (miócitos) e em células endoteliais das artérias coronárias (SPIECKER, 2004; WU, 1966).

Outros tecidos, como o hepático, o renal, o pulmonar e o trato gastrointestinal, também expressam o CYP2J2 (KING, 2002).

Estudo recente, com 139 componentes, identificou que o albendazol, a amiodarona, a Cyclosporina a, o Danazol, o Tamoxifeno e a Tioridazina são substratos de CYP2J2, confirmando a hipótese de que este citocromo tem a capacidade de metabolizar compostos estruturalmente muito diferentes. Substratos identificados para o CYP2J2 também são metabolizados pelo CYP3A4, mas com seletividade em diferentes regiões (LEE, 2005; LEE, 2010). Em função de seu previsto papel protetor em doenças cardiovasculares, o CYP2J2 tem sido muito estudado. Seu papel no câncer está em investigação. Há cerca de 10 alelos descritos para o CYP2J2, de acordo com o Comitê de Nomenclatura do Citocromo P450 Humano. A variante funcional mais conhecida é o alelo CYP2J2 \*7, ocorrendo numa frequência de 2,1 a 17% (LEE, 2010). O polimorfismo que define a variante CYP2J2, rs890293, está localizado no promotor proximal do citocromo, correspondendo à troca de T > G. Considerado o mais comum polimorfismo funcional deste CYP, muitos estudos foram realizados procurando pela associação entre este polimorfismo e variadas doenças.

### 1.3.3 POLIMORFISMOS RELACIONADOS AOS ANTICOAGULANTES TRADICIONAIS

O gene do Citocromo P450, Família 2, Subfamília C, Polipeptídeo 9 (CYP2C9), está localizado no cromossomo 10, região 10q24, enquanto o gene da Subunidade de Complexo 1 da Vitamina K Epóxido Redutase (VKORC1) está localizado no cromossomo 16, na região 16p11.2 Este gene apresenta 3 exons e 5 Kb de tamanho (LI et al.2004; ROST et al.2004)

Assim como VKORC1, o gene CyP2C9 também está envolvido com a metabolização da warfarina, mais especificamente com a farmacocinética da mesma no organismo.

Quimicamente, o anticoagulante Warfarina é uma mistura racêmica, ou seja, é um composto de dois isômeros enantiomórficos: a S-warfarina e a R-warfarina.

Em humanos, a S-warfarina é metabolizada predominantemente pela enzima Citocromo P-450, CYP2C9, em seu principal metabólito 7-hidróxiwarfarina. (DALY, 2003; RETTIE, 1992).

A S-warfarina representa 60-70% da resposta anticoagulante, enquanto o R-enantiômero é responsável por cerca de 30-40% (TAKAHASHI, 2001).

Dessa forma, variações genéticas no CYP2C9 podem potencialmente levar a variações na dose interindividual da warfarina e na eficácia da mesma. (KAMINSY, 1997; THIJSEN, 2000).

O alelo mais comum do CYP2C9 é designado CYP2C9\*1, e é considerado o genótipo de tipo selvagem. Até o momento, mais de 50 variantes do CYP2C9 têm sido descritos, entretanto duas variantes, CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3, são as mais examinadas na literatura por serem mais relevantes nas implicações clínicas para a dosagem e prevenção de efeitos adversos da Warfarina.

Estas isoenzimas do CYP2C9 têm apenas uma fração do nível de atividade da enzima do tipo selvagem, CYP2C9\*1: 12% de CYP2C9\*2 e 5% para CYP2C9\*3.

A direta associação entre o genótipo CYP2C9 e anticoagulação ou sangramento foi primeiramente relatada por Higashi (2002). Posteriormente, uma meta-análise sistemática mostrou que os pacientes com ambos o CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3 precisavam de uma menor dose de manutenção da Warfarina, e isto foi especialmente pronunciado para os indivíduos portadores da variante CYP2C9\*3, em que a redução da dose foi, em média, 30% (SaNDERSON, 2005; HIGASHI, 2002).

Este estudo está de acordo com a metabolização previamente conhecida do fármaco, já que indivíduos com as variantes 2 e 3, que são mais propensos a precisar de doses mais baixas de warfarina, levam mais tempo para atingir o valor de INR (Índice Internacional Normalizado), ou seja, metabolizam a droga mais lentamente e, dessa forma, têm um risco aumentado de complicações hemorrágicas.

Dessa maneira, segundo o modelo fisiológico o estado estacionário das concentrações plasmáticas ( $C_u$ ) de uma administração oral de fármacos é eliminado principalmente pelo metabolismo hepático que depende unicamente da depuração hepática ( $CL_{int,h}$ ) para a droga. Este parâmetro farmacocinético representa a atividade hepática da enzima envolvida no metabolismo do fármaco. Sendo assim, a atividade hepática do CYP2C9 seria um dos determinantes mais críticos de variabilidade interindividual na resposta anticoagulante à Warfarina (WILKINSON, 1975).

O gene VKORC1 codifica a Vitamina K Epóxido Redutase Subunidade 1, uma proteína transmembrana pequena do retículo endoplasmático, que desempenha um papel importante na via da vitamina K e é a proteína alvo de vários anticoagulantes orais, entre eles a Warfarina (ROSS, 2010; SUAREZ-KURTZ, 2012).

A vitamina K, depois de absorvida, é convertida em epóxido ativo e atua como cofator para a carboxilação de resíduos específicos de ácido glutâmico para formar o ácido gama carboxiglutâmico (Gla), possibilitando assim a adesão dos fatores da coagulação aos fosfolípidos de superfície, acelerando o processo de coagulação. Estes fatores de coagulação são os fatores II, VII, IX e X, bem como as proteínas C e S. (DORES, 2001; ELDER, 2006; SHEARER, 1995).

A vitamina K, em sua forma reduzida (vitamina KH<sub>2</sub>), atua como um co-fator essencial para o processo de gama-carboxilação dos fatores de coagulação descrito anteriormente. Durante esse processo, a vitamina KH<sub>2</sub> é oxidada à epóxi vitamina K, e a seguir retorna à forma reduzida (vitamina KH<sub>2</sub>) pela ação de duas redutases (vitamina K redutase e vitamina K epóxi redutase), completando o chamado ciclo da vitamina K.

Dessa forma, por participar da síntese de diversas proteínas do complexo da Protrombina, fica claro que a vitamina K é essencial para o processo de coagulação sanguínea. Sendo assim, ela é alvo de diversos medicamentos orais anticoagulantes, entre eles a Warfarina (TONDATO, 2004).

Este fármaco exerce seus efeitos anticoagulantes impedindo a capacidade do VKORC1 de regenerar a forma reduzida da vitamina K epóxido, diminuindo a produção dos fatores II, VII, IX e X e, conseqüentemente, levando à redução da coagulação (Figura 03).

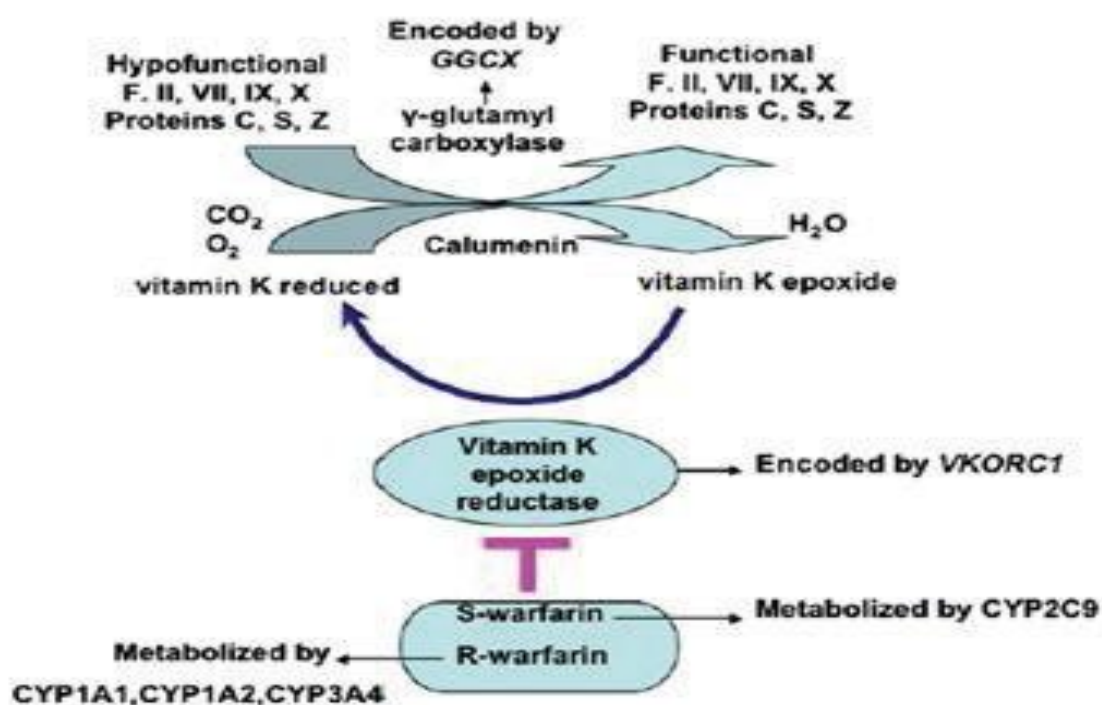


Figura 03. Via de metabolização da Warfarina.  
Fonte. LIMA et al, 2010

A dose de Warfarina necessária para inibir a regeneração de vitamina K é influenciada, entre outros fatores, por mutações no gene do Citocromo P 450, como variantes alélicas de CYP2C9 e polimorfismos genéticos da subunidade do Complexo 1 da Vitamina K Epóxido Redutase, ou seja, VKORC1 (LIMA, 2010).

Estudos confirmam que SNPs em VKORC1 e no metabolismo do gene CYP2C9 (citocromo família P450, 2, C, subfamily polipeptídeo 9) preveem cerca de 40% da variação de dose, enquanto fatores não genéticos (idade, sexo, etc.) em conjunto representam em média somente 15% (WADELIUS, 2009).

Investigações indicam que os polimorfismos 1639G-> a (rs9923231, no promotor) e 1173C> T (rs9934438 - no intron 1) no gene VKORC1 estão associados com uma redução de aproximadamente 30% na dose de warfarina (RETTIE et. al, 2006). Em contraste, o polimorfi 3730G> a (rs7294 - 3'UTR), no mesmo gene, tem sido associado com um aumento da dose do anticoagulante (RETTIE, 2006; WADELIUS, 2007).

#### 1.4 O Rivaroxaban

O Rivaroxaban constitui-se no primeiro inibidor oral direto do fator Xa desenvolvido nos últimos anos, a receber autorização para uso clínico (BAYER PHARMA, 2010). A inibição direta de um único fator de coagulação foi usada para contornar as limitações dos anticoagulantes tradicionais

Estudos pré-clínicos mostraram um potente efeito anticoagulante do Rivaroxaban no plasma, bem como a habilidade em prevenir e tratar eventos trombóticos arteriais e venosos em modelos animais. Isto levou ao desenvolvimento de pesquisas de fase I, com grupos pequenos de voluntários saudáveis, a fim de realizar a avaliação preliminar da segurança e do perfil farmacocinético da nova droga (KUBITZA, 2013).

Ficou demonstrado que a nova molécula apresentava efeitos farmacodinâmicos e farmacocinéticos previsíveis, com poucas interações relevantes quando do uso concomitante com drogas habituais, e que interagem, sabidamente com a warfarina, e que os efeitos farmacodinâmicos estiveram bem correlacionados com os níveis séricos da droga no plasma (KUBITZA, 2013; PERZBORN, 2005). Esses achados definiram a progressão da pesquisa clínica até os estudos randomizados e ampliados de fase III.

O fator X desempenha papel-chave na regulação da hemostasia, e sua forma ativada, o fator X ativado (fator Xa), tem função primordial porque é quem catalisa a produção de trombina, a enzima que converte o fibrinogênio circulante em fibrina, levando à formação do coágulo. a ativação desta proteína ocorre tanto através da via extrínseca, quanto da via intrínseca (KOLLER, 1960) (Figura 04).

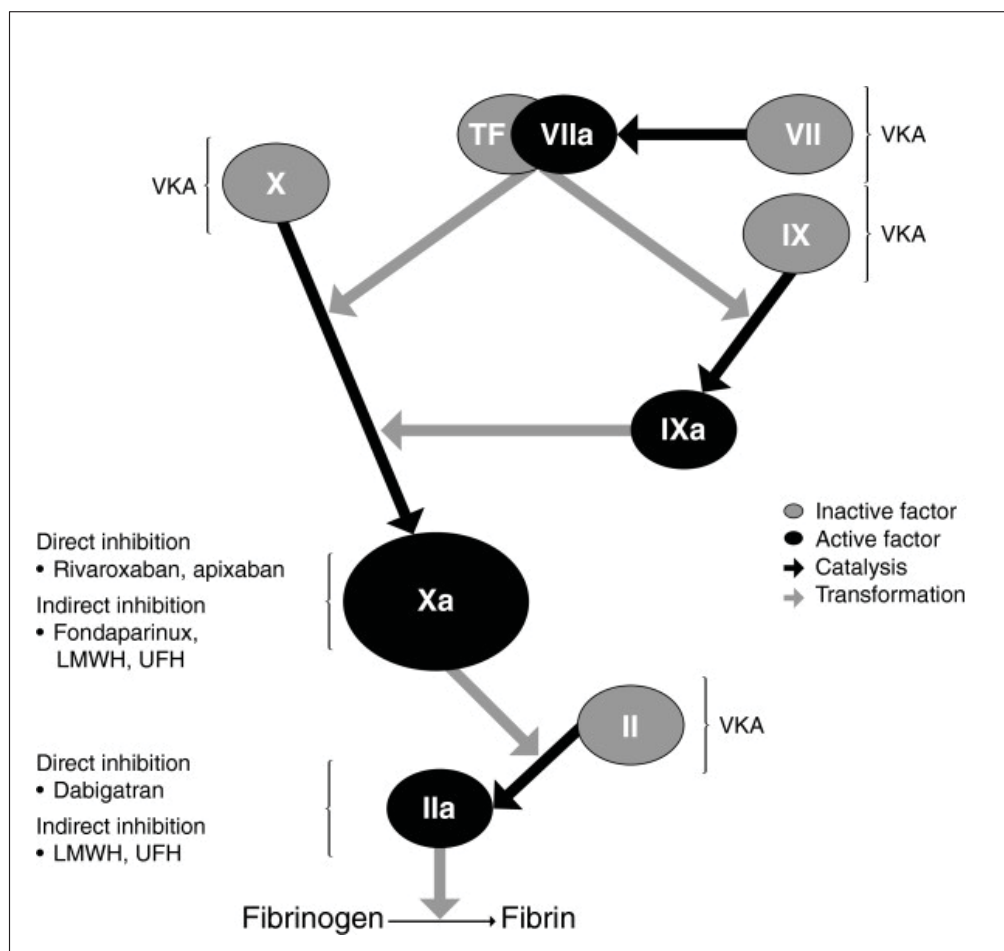


Figura 04. Cascata da coagulação e o alvo dos novos anticoagulantes.  
 Fonte. MUECK, 2013.

O fator Xa é considerado um alvo mais atraente para a ação dos novos anticoagulantes, devido à evidência que para catalisar a produção de aproximadamente 1000 moléculas de trombina, seria necessária uma molécula deste fator apenas, o qual é encontrado numa proporção inferior à da protrombina no plasma, mas tem sua ação beneficiada pela amplificação inerente das reações em cadeia que compõem a chamada cascata de coagulação (KUBITZA, 2013).

Estudos iniciais com inibidores naturais do fator Xa já indicavam que esta molécula poderia ser um alvo efetivo a produzir anticoagulação. Dentre estes, destacam-se os trabalhos de Dunwiddie (1989) e Nicolini (1996).

Estudos posteriores com o agente sintético de inibição indireta do fator Xa Fondaparinux trouxeram a prova de que a inibição seletiva desta molécula poderia produzir a anticoagulação (TURPIE, 2002).

A inibição seletiva do fator Xa produz efeito antitrombótico devido à redução da geração de trombina, o que diminui a ativação da coagulação e das plaquetas, mediada por esta, sem afetar a atividade da trombina já existente (LEKO, 2004).

#### 1.4.1 PERFIL FARMACODINÂMICO PRÉ-CLÍNICO

Dentre as mais de 200.000 substâncias capazes de inibir seletivamente o fator Xa humano, o Rivaroxaban provou ser a principal delas, devido à: 1) alta afinidade pelo fator Xa; 2) potência satisfatória “in vitro”; 3) atividade antitrombótica “in vivo”; 4) biodisponibilidade oral adequada (KUBITZA, 2005).

O seu mecanismo de ação é a inibição por antagonismo de competição direta e específica do fator Xa, apresentando 10.000 vezes mais afinidade por esta molécula, do que por outras protease séricas. Inibe diretamente o complexo protrombinase, e também a atividade do fator Xa (clot bound) no plasma. No sangue total e no plasma rico em proteínas o Rivaroxaban prolonga, significativamente, a fase de iniciação da geração de trombina, reduzindo a fase de propagação da coagulação após a ativação do fator tecidual (KUBITZA, 2005; PERZBORN, 2005).

Modelo de estase venosa em ratos mostrou que a metade de dose efetiva máxima de Rivaroxaban afetou suavemente o TP e a atividade do fator Xa, enquanto a dose que produziu a inibição total de formação de trombos prolongou moderadamente o tempo de protrombina (TP) e inibiu a atividade do fator Xa, enquanto modelos de shunts arteriovenosos em ratos e coelhos mostraram inibição de 74% e 92% na atividade do fator Xa, após o Rivaroxaban oral (PERZBORN, 2005).

O trabalho de Perzborn colaborador trouxe a primeira evidência farmacodinâmica da efetividade do Rivaroxaban tanto no território venoso, quanto no território arterial (KUBITZA, 2013).



#### 1.4.2 PERFIL FARMACODINÂMICO EM ENSAIOS CLÍNICOS

Ensaio de fase I, com pequenos grupos de pacientes masculinos saudáveis, mostraram resultados compatíveis com os achados laboratoriais da fase pré-clínica, confirmando efeitos anticoagulantes da droga em humanos (KUBITZA, 2005).

Estudos com dose única mostraram efeitos de inibição dose-dependente, com 75% de redução da atividade do fator Xa com 80mg de Rivaroxaban, enquanto doses múltiplas mostraram que, após a inibição máxima do fator Xa e alargamento do Tempo de Protrombina, não houve efeitos cumulativos, denotando a previsibilidade de ação da droga após doses repetidas. Efeitos de inibição máxima do fator Xa, tanto com a forma suspensão quanto comprimidos, foi alcançado após 45 minutos e 1-4 horas, respectivamente (KUBITZA, 2005).

Nos ensaios de fase II, investigadores compararam Rivaroxaban com Enoxaparina na prevenção do Tromboembolismo Venoso (TEV) após artroplastia de quadril ou joelho. As observações mais importantes foram relativas a efeitos farmacodinâmicos previsíveis tanto com dose única, quanto duas vezes ao dia; a inibição do fator Xa e alargamento do Tempo de protrombina (TP) correlacionados rigorosamente com a concentração plasmática do Rivaroxaban; os achados foram compatíveis com aqueles dos estudos pré-clínicos e com os da fase I (ERIKSSON, 2007).

Os achados encorajadores dos ensaios de fase II levaram à progressão da pesquisa clínica, envolvendo séries maiores de pacientes de múltiplos centros (de pesquisa) em estudos de fase III, para avaliar a eficácia em várias indicações de tromboembolismo, como a já mencionada profilaxia do tromboembolismo venoso nas cirurgias ortopédicas de grande porte, no tratamento da Trombose Venosa Profunda (TVP) e Embolia Pulmonar (EP), nos Acidentes Vasculares Encefálicos (AVE) em pacientes com Fibrilação Atrial, e na prevenção secundária das Síndromes Coronarianas Agudas. (ERIKSSON, 2008; KAKKAR, 2008; LASSEN, TURPIE, 2009).

### 1.4.3 PERFIL FARMACOCINÉTICO E RELEVÂNCIA CLÍNICA

Os dados de análises pré-clínicas mostraram propriedades previsíveis, tais como rápida absorção; uma biodisponibilidade moderada a alta em ratos e cães, respectivamente; concentrações plasmáticas dose-relacionadas e com pequena variabilidade entre os animais, dentro dos intervalos de dose testados (WEINZ, 2005).

Duas vias de excreção foram observadas em todas as espécies testadas: a biliar/fecal; e a urinária. Ocorreu recuperação total de cerca de 91% dos subprodutos em testes com radioatividade (KUBITZA, 2013).

Em estudos de fase I com voluntários masculinos saudáveis, o Rivaroxaban mostrou absorção rápida após administração oral e atingiu pico de concentração plasmática com cerca de quatro horas (KUBITZA, 2005).

A exposição ao Rivaroxaban, em termos de concentração plasmática máxima, foi dose-proporcional para doses até 10mg independentemente da ingesta alimentar concomitante; e dose-proporcional para todas as dosagens superiores a 30mg, duas vezes ao dia, se administrado junto com alimentos. Para que alcancem alta biodisponibilidade, doses de 15 a 20mg de Rivaroxaban devem ser ingeridas com alimentos (STAMPFUSS, 2013).

Aproximadamente dois terços da droga é metabolizada pela via do citocromo P450 CYP 3a4, CYP2J2 e mecanismos independentes do CYP. Os dois terços metabolizados, o são via hepática, onde metade é transformada em metabólitos inativos e excretada via hepatobiliar, e a outra metade em metabólitos inativos que serão excretados via renal. O terço restante administrada é excretado como droga inativa pelos rins.

Na figura (05), as vias do CYP3A4 e CYP2J2 corresponderiam a, aproximadamente, 32% de toda a metabolização do novo fármaco (Figura 05).

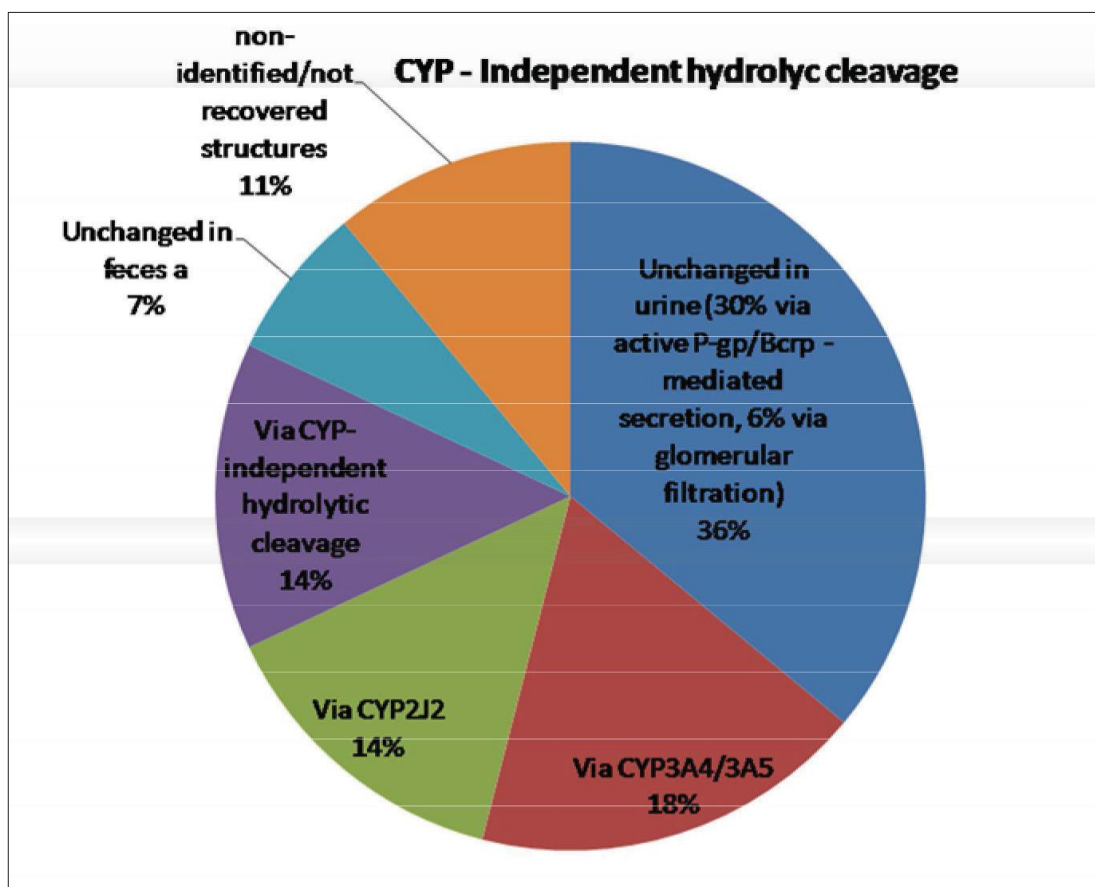


Figura 05. Metabolização e vias de eliminação do Rivaroxaban baseadas em estudos *in vitro* e em ensaios clínicos.

Fonte. MUECK, 2013.

A sua toxicidade está relacionada a eventos hemorrágicos graves. Superdosagens relacionadas a eventos hemorrágicos podem ser tratadas com Carvão ativado e medidas de compressão mecânica e suporte hemodinâmico. a utilização de Complexo de Protrombina Ativada, Complexo de Protrombina e Fator VII Recombinante, além da Hemodiálise são medidas necessárias em caso de sangramento não controlado.

Estudos de fase I, envolvendo voluntários saudáveis, mostrou que não há efeito clinicamente relevante na farmacodinâmica do Rivaroxaban, quando ministrado concomitantemente com a Atorvastatina, ou a Digoxina, substratos, respectivamente, do CyP3a4 e da glicoproteína P transportadora, e da glicoproteína P isolada (KUBITZA, 2012; MUECK, 2013). Substâncias que inibem apenas uma via de eliminação, como os antibióticos Claritromicina e Eritromicina, e o antifúngico

Fluconazol, causam apenas uma discreta elevação na exposição ao anticoagulante, mas sem repercussão clínica que justifique uma correção na posologia (MUECK, 2013). Contudo, quando administrado com substâncias consideradas fortes inibidores das vias do CYP3A4 e da glicoproteína – P transportadora, como o Cetoconazol e o antirretroviral Ritonavir, houve expressiva elevação da concentração plasmática do fármaco (158 e 153%, respectivamente), com alterações nos seus efeitos farmacodinâmicos, que podem acarretar risco de sangramento. (MUECK, 2013; BAYER PHARMA, 2013). Dessa forma, o uso concomitante com esse grupo de antimicóticos sistêmicos, bem como com os inibidores de proteases do HIV, não é recomendável (MUECK, 2013; KREUTZ, 2012). alguns agentes, como o antibiotico Rifampicina (um indutor forte do CyP3a 4), podem produzir um decréscimo na concentração plasmática do Rivaroxaban, e precisam ser utilizados com cautela. Outros xenobióticos indutores, como alguns anticonvulsivantes, como a Carbamazepina, e suplementos vegetais do tipo St. john's wort, também necessitam ser utilizados com cautela.(KREUTZ, 2012; BAYER PHARMA, 2013).

### 1.5 Bases da coagulação

O sistema de coagulação é fundamental para a manutenção da hemostasia. Ele equivale a uma cadeia de reações enzimáticas, com conversão de proenzimas em enzimas ativadoras de outras proenzimas e, em cada passagem o sistema é potencializado, para chegar ao produto final, que é o polímero de fibrina, o qual vai estabilizar o coágulo. Na sequência de reações que a caracterizam, aparecem sistemas regulatórios que impedem a propagação da coagulação, o que corresponde a um bloqueio fisiológico da chamada “cascata”, e contribuem para a manutenção da homeostase hemorragia-coagulação. Embora os ensaios iniciais sobre o tema remontem a 1904, as primeiras descrições completas da cascata de coagulação datam de 1964, com publicações nos periódicos Nature e Science, pelos autores Macfarlane e Davie, respectivamente, com seus grupos de colaboradores.

A coagulação pode ser entendida como uma cascata enzimática com duas vias: 1) via intrínseca, onde o processo se desencadearia a partir do contato do sangue com determinadas superfícies; 2) via extrínseca, onde para ser ativada a coagulação há necessidade de lesão tecidual. Estas vias correspondem a sistemas complexos de interações e retroalimentação entre seus diversos complexos enzimático-proteicos, e há uma via FINAL comum aos dois braços desta cascata. O gatilho das duas vias é a ativação do Fator Tecidual ou Tissular (FT), e a ativação do Fator XII proporcionada pela interação do sangue com uma superfície estranha, e esses dois fenômenos vão levar à ativação do Fator X pela via comum (Figura 6).

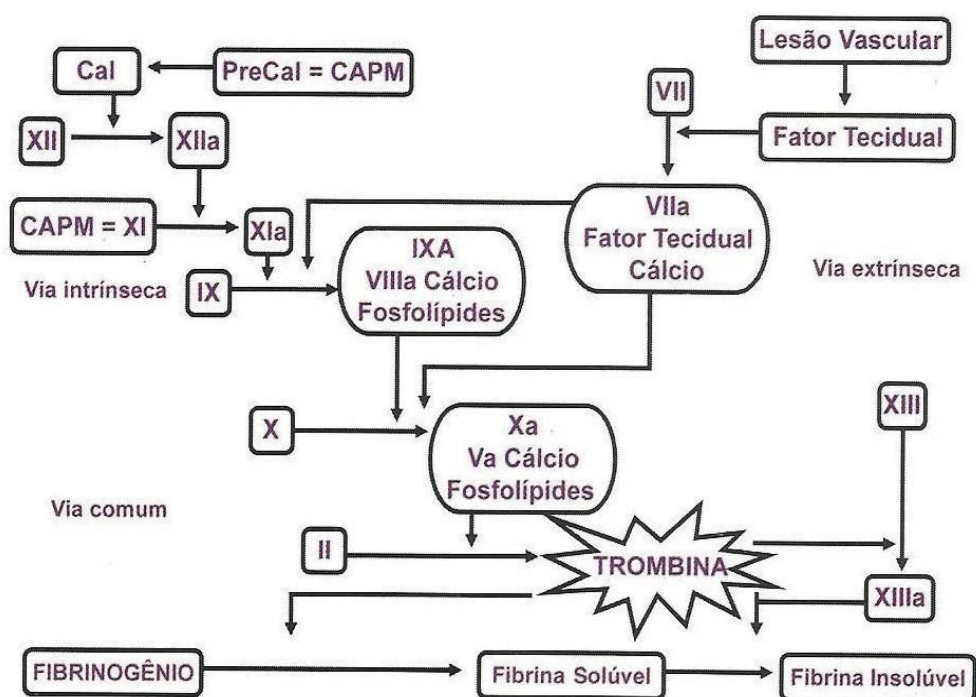


Figura 06. Vias intrínseca e extrínseca de ativação dos mecanismos da coagulação. a partir da ativação do fator X, inicia-se a via comum que finaliza com a formação da malha de fibrina insolúvel.

Fonte. FISILOGIA DA COAGULAÇÃO. In Doenças Vasculares Periféricas. 4ªEd. Vol.I, página 207.

### 1.5.1 O PAPEL DAS PLAQUETAS

Além das proteínas plasmáticas que atuam de forma encadeada no mecanismo, as plaquetas desempenham um papel importante. a concentração das proteínas já mencionadas (os fatores de coagulação) é baixa, e isso dificulta a sua aproximação

e consequente ativação. Esse cenário se modifica a partir da presença de moléculas de fosfolípídeos, que aceleram a sua absorção e aumentam a sua concentração na superfície celular, como ocorre nas plaquetas e/ou na exposição de colágeno sub-endotelial.

As plaquetas secretam fator VIII antígeno, que forma um complexo molecular com a fração livre e circulante do fator VIII, e esse complexo é mantido em sua superfície. O fator V é secretado por ela, e é um importante receptor para o fator Xa. Este e moléculas de trombina ativam a plaqueta, que sofre alterações estruturais, invertendo a constituição de sua membrana celular, aumentando os fosfolípídeos em sua superfície (chamado fator plaquetário 3), criando uma carga negativa que facilita a ligação dos aminoácidos terminais dos fatores IX, X e II (protrombina). Portanto esse mecanismo, mediado pela célula plaquetária, aumenta localmente a concentração dos fatores e funciona como um potencializador das reações da cascata.

Elas são, portanto, importantes como localizadoras do fenômeno de coagulação, e respondem pelo coágulo primário (tampão hemostático), agregando-se entre si, e secretando substâncias estocadas que vão agir sobre outras plaquetas, sobre o endotélio e sobre o sistema de coagulação.

As plaquetas estão envolvidas na *Fase de Iniciação* da coagulação, uma vez que é em sua superfície que se forma o Complexo Protrombinase, resultante da associação do fator Xa com o fator Va. Este complexo é que vai agir sobre as pequenas quantidades de Protrombina local, formando as primeiras moléculas de trombina. A ativação deste complexo na superfície plaquetária vai dar início à *Fase de Propagação* da coagulação, onde plaquetas ativadas pela trombina formada a partir da ação do FT vão liberar os fatores V e XI de seus grânulos. as plaquetas ativadas expõem a carga negativa dos fosfolípídes, facilitando o acúmulo local de fatores e cofatores, que vão facilitar a propagação do fenômeno.

### 1.5.2 A VIA INTRÍNSECA

O fator XII é uma glicoproteína de cadeia única, com cerca de 80.000 daltons, que tem grande afinidade por superfícies de carga negativa, como o tecido conjuntivo do colágeno subendotelial, por exemplo. Ao ligar-se a essa superfície, ocorrerá a sua ativação, com alteração conformacional seguida de clivagem (ao entrar em contato com a pré-caliceína), produzindo uma molécula menor com atividade enzimática sobre o fator XI. Na presença de cininogênio de alto peso molecular, este fator é ativado, e converte o fator IX em forma ativada. O fator IX ativado tem ação lenta sobre o fator X, e necessita do fator VIII ligado diretamente aos fosfolípidos, e da presença do cálcio, para incrementar sua ação enzimática sobre o fator X. A partir deste ponto, inicia-se a via comum da coagulação.

### 1.5.3. A VIA EXTRÍNSECA

Também conhecida como Via alternativa, está relacionada ao Fator Tecidual (FT) ou TROMBOPLASTINA TECIDUAL, que é uma proteína sintetizada por células endoteliais, monócitos, macrófagos, e tecidos extra-vasculares, como a adventícia, epitélio, mucosas, astrócitos ou células do endométrio. O FT junto com fator VII converte o fator X em forma ativada. O fator Xa, por sua vez, pode converter o fator VII, numa fração mais ativa, a Alfa VII a um mecanismo de retroalimentação do sistema. A partir deste ponto, as reações são comuns aos dois sistemas. Praticamente todos os tecidos, em maior ou menor quantidade, têm a capacidade de ativar a coagulação por esta via, quando lesados. Pelo já exposto, a eficácia da via dependerá de proporções ideais de proteína e fosfolípidos.

### 1.5.4 A VIA COMUM

Corresponde à ativação do fator II ou Protrombina pelo fator Xa. a Protrombina é convertida em Trombina graças a duas clivagens sequenciais, catalisadas do fator

Va, secretado pelas plaquetas. A Trombina vai agir sobre o Fibrinogênio circundante e o fixado aos receptores das Plaquetas. A Trombina recém-formada pode ativar o seu próprio precursor.

O Fibrinogênio é composto por três pares de cadeias polipeptídicas, que sofrem sucessivos processos de clivagem e alteração conformacional, formando inicialmente os monômeros e, posteriormente, os polímeros de Fibrina (monômeros ligados lado a lado por pontes hidrófobas). Nessa fase, o polímero ainda é friável e perde essa condição graças à ação de outra proteína, o Fator XIII, ativada pela própria Trombina, da qual resultará o aparecimento de ligações covalentes, que vão estabilizar a molécula. A maior produção de Trombina ocorre depois da formação do coágulo de Fibrina, e aí ela passa a agir também como um regulador dos fenômenos trombóticos, ao ativar o sistema das proteínas S e C, que inativam os cofatores V e VIII ativados.

Os fatores de coagulação que possuem um ou mais radicais carboxila incorporados aos resíduos do ácido glutâmico na sua síntese hepática, através da vitamina K endógena, são o II, o VII, o IX e o X, além da proteína C. São os alvos da ação da droga cujo metabolismo estamos discutindo, a partir da identificação de polimorfismos específicos, e estão presentes tanto na via intrínseca, quanto na extrínseca e na comum da cascata de coagulação.

O consenso atual é de que o chamado Fator Tecidual (FT) forma um complexo com Fator VIIa, que ativa tanto o Fator X como o IX. A existência de uma proteína que inibe a via de ação deste complexo, e evidências de que a ausência de alguns fatores de coagulação da chamada via de contato não provocavam complicações hemorrágicas, reforçam o conceito que o principal caminho para a ativação da coagulação é pela via extrínseca e com a ação do Fator Tecidual.

## 2. JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE DO ESTUDO

A Farmacogenética, em seu estado atual de desenvolvimento, apoia-se na melhor compreensão da diversidade de Genoma Humano e de seu impacto na



Farmacocinética e Farmacodinâmica de uma grande variedade de fármacos, de uso corrente em diversas áreas das ciências médicas, dentre as quais a oncologia e a medicina cardiovascular. A heterogeneidade observada na resposta interindividual à ação de diversas drogas e o seu estudo constituem os pilares da Farmacogenética. O aforisma “A dose certa da droga certa para a pessoa certa” expressa de maneira utópica, mas bastante precisa, o que vem a ser, talvez, o grande objetivo desse ramo da ciência nos dias atuais. Portanto esta é a sua contribuição no rumo de uma prática médica cada vez mais individualizada.

A existência de diferenças interétnicas, em relação à variabilidade encontrada em genes envolvidos com a resposta aos fármacos, é um fator importante para a interpretação dos resultados de testes de resposta terapêutica. Em investigações do tipo de associação, os resultados podem ser mal interpretados em função da existência de uma estratificação populacional não identificada, entre as amostras investigadas. Esse fato é particularmente importante quando as investigações são realizadas em populações miscigenadas em um passado relativamente recente (como é o caso do processo de formação da maioria da população brasileira). Logo, controlar o efeito da etnicidade, é importante, principalmente, em populações que historicamente apresentam elevados graus de mistura interétnica (SUAREZ-KURTZ, 2005; DAAR e SINGER, 2005).

Com o objetivo de contribuir para a solução desse problema, no presente trabalho foi utilizado um conjunto de 62 marcadores bialélicos, informativos de ancestralidade como controle genômico em estudos farmacogenéticos.

a variação na frequência dos polimorfismos de genes relacionados ao metabolismo de anticoagulantes tradicionais, em populações miscigenadas de origem africana, mostrou-se um dado importante. A partir da observação da elevada ocorrência de alelos de ancestralidade europeia, considerados raros em populações africanas nativas, e dos efeitos desse achado na performance dos algoritmos de dosagem da Warfarina, ratificou-se a importância do estudo da ancestralidade das populações. Este é um dado que tem repercussões clínicas evidentes.

Suarez-Kurtz identificou nos brasileiros a elevada frequência de distribuição da mutação rs9923231 do gene VKORC1, correlacionando este achado à ancestralidade africana, independente da “cor” relatada ou raça dos pacientes pesquisados (SUAREZ-KURTZ, 2012; HUTZ, 2011). Perini et al. (2008) encontraram resposta efetiva a menores doses de Warfarina em população miscigenada brasileira e em alguns grupos de afroamericanos, relacionada aos alelos rs8050894 e rs2884737, do mesmo gene.

A compreensão do papel que tais alterações genéticas desempenham no metabolismo da Warfarina levou à criação de diferentes algoritmos, nos quais a identificação desses polimorfismos nas diferentes populações, associado a outras variáveis já mencionadas anteriormente, pudesse contribuir para uma prescrição mais racional desta droga. Tais algoritmos têm por objetivo expressar um Coeficiente de Correlação entre a dose prevista e a dose prescrita do medicamento, naturalmente, visando a aproximar esta daquela.

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de séculos de cruzamentos entre pessoas provenientes de três continentes: europeus, africanos e ameríndios. Assim sendo, nossa população seria a resultante da mistura das três maiores componentes histórico-geográficas da humanidade (SUAREZ, 2007).

Em nossa população não existem dados disponíveis acerca da presença e distribuição de polimorfismos no CYP 3A4 e no CYP 2J2, polimorfismos estes que possuem importância para o metabolismo do Rivaroxaban. Partindo da hipótese de que as variações nos genótipos relacionados ao CYP3A4 e ao CYP2J2 possam influenciar na absorção e biodisponibilidade deste novo anticoagulante, temos uma justificativa, sólida ao nosso ver, para definir o perfil molecular dos referidos citocromos em uma amostra de nossa população. Por outro lado, dados de excreção e metabolização desta droga, derivados de estudos em humanos e em resultados “in vitro” de reações de fenotipagem do CYP, mostraram que a participação destas vias na metabolização do fármaco, corresponderiam a cerca de 18% para o CYP3A4, e 14% para o CYP2J2, do total da excreção hepática (MUECK, 2013).

Nesse contexto, desenvolvemos nosso estudo. Considerando o novo anticoagulante disponível no mercado, e a pequena quantidade de dados sobre a farmacogenética do mesmo, aliada à possibilidade de que os polimorfismos relacionados à sua metabolização possam ser fonte de variabilidade genética, é possível que aspectos da etnicidade de nossa população forneçam dados que ajudem, futuramente, em uma aplicação mais racional deste fármaco em nossa população específica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar inferências de epidemiologia molecular dos polimorfismos nos genes CYP3A4 (rs2246709) e CYP2J2 (rs890293), relacionados ao metabolismo da Rivaroxaban, numa população da Região Norte. Foram analisadas 136 amostras da população miscigenada de Belém-PA.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil molecular dos genes CYP3A4 (rs2246709) e CYP2J2 (rs890293) na população Norte do Brasil;
- Estimar as frequências do polimorfismo no gene CYP3A4 (rs2246709);
- Estimar as frequências do polimorfismo CYP2J2 (rs890293);
- Realizar o controle genômico da ancestralidade nas amostras investigadas.

### 4 . CASUÍSTICA E MÉTODO

#### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo epidemiológico, transversal, observacional dos polimorfismos nos genes CYP3A4 (rs2246709) e CYP2J2 (rs890293), relacionados ao metabolismo da Rivaroxaban numa população da Região Norte.

## 4.2 Amostras

Foram estudadas 136 amostras de sangue periférico de indivíduos sadios da população de Belém.

## 4.3 Processo de seleção

Foram selecionadas 136 amostras de sangue de indivíduos sadios, que constituem o Banco de Material Genético do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará.

## 4.4 Critérios de inclusão

Indivíduos, de ambos os sexos, selecionados no Banco de Material Genético do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará.

## 4.5 Critérios de exclusão

Indivíduos, de ambos os sexos, cujo material genético não faça parte do Banco de Material Genético do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará

## 4.6 Avaliação de risco e benefício

### 4.6.1 RISCOS

Os riscos da realização do estudo são mínimos, visto que não haverá contato físico com os pacientes, uma vez que as amostras selecionadas já fazem parte do Banco de Material Genético do Núcleo de Pesquisas em Oncologia. Como risco poderia ser revelada a identidade dos indivíduos, o que será minimizado com a codificação das amostras.

### 4.6.2 BENEFÍCIOS

Esta pesquisa poderá contribuir para a identificação dos polimorfismos dos genes relacionados ao metabolismo do Rivaroxaban na população da região Norte, visando a um melhor controle do manejo desta droga, minimizando seus riscos.

## 4.7 Procedimentos

### 4.7.1 COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL

O material genético será extraído a partir do sangue total pelo método convencional com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, conforme descrito por Sambrook et al.(1989). A concentração do DNA das amostras foi calculado pelo índice de absorvância (a) das bases a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop™ ND- 1000 (Thermo Scientific). Posteriormente, o DNA foi armazenado no freezer -80°C. a análise molecular dos polimorfismos será realizada com o sistema TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA). O sistema TaqMan utiliza uma sonda fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico da PCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação

### 4.7.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Na análise estatística referente à associação dos polimorfismos investigados com a via do CYP3A4 e CYP2J2 será empregado o programa SPSS 20.0 (SPSS Ins. Chicargo, IL, USa). Análises relativas à subestruturação populacional serão realizadas empregando-se o programa STRUCTURE V, para obtenção das ancestralidades individuais de cada indivíduo investigado de maneira a ser controlado o efeito da subestruturação nos estudos de associação (PRITCHARD, 2000).

## 4.8 Aspectos éticos

A proposta será elaborada obedecendo às diretrizes e normas da Resol. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que estabelece normas para pesquisa envolvendo seres humanos. Esta pesquisa não apresenta conflito de interesses, tendo sido realizada no Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará com recursos próprios desta instituição.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao longo dos últimos cinquenta anos, os anticoagulantes orais têm sido uma das drogas mais utilizadas e prescritas no mundo todo (RACHED, 2008; ANSELL, 2008). Dentro de diretrizes já bem definidas, o anticoagulante oral mais antigo, a Warfarina Sódica, já se mostrou eficaz na prevenção e tratamento de fenômenos tromboembólicos, tanto arteriais, quanto venosos, daí sua incorporação definitiva ao arsenal terapêutico contemporâneo. No entanto o fato de ser um fármaco de margem terapêutica restrita, e que necessita de um controle laboratorial bastante estrito, sempre trouxe dificuldades no seu manejo clínico (ANSELL, 2008; HYLEK, 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1983).

A terapia antitrombótica convencional, na qual está inserido o uso deste anticoagulante oral, além das duas formas disponíveis de Heparina, tem um risco potencial de sangramento, com limitações já bem definidas. As características de um anticoagulante ideal, para a utilização nos dias atuais, seriam: 1) ser de administração oral; 2) ter ação rápida e previsível; 3) ter uma janela terapêutica mais larga; 4) dispensar controle laboratorial rígido para ajuste da dosagem; 5) ter uma boa relação eficácia x segurança; 6) possuir pouca interação com drogas e alimentos; 6) ser passível de uso em pacientes com insuficiência renal e hepatocelular, idosos ou em extremos de peso; 7) possuir um antídoto disponível (BONDARENKO, 2013).

Nesse contexto, foram desenvolvidos os novos anticoagulantes orais. A molécula Bay 59-7939, chamada Rivaroxaban, é um inibidor sintético direto do Fator Xa, que se liga a esta proteína, tanto em sua forma livre, quanto na forma combinada ao Complexo Protrombinase, bloqueando a coagulação sanguínea na chamada fase de propagação (EINSTEIN INVESTIGATORS, 2010; PERZBORN, 2005). Constitui-se numa das três drogas novas, hoje liberadas pelas instâncias de vigilância sanitárias competentes, para uso clínico. As demais são os Pentassacrídeos Sintéticos e os Inibidores Diretos da Trombina (HERBERT, 1998; BULLER, 2003; GUSTAFSSON, 2003).

Em relação à droga padrão Warfarina, ainda a mais utilizada no mundo, a nova droga Rivaroxaban vem oferecer resposta a várias das dificuldades relacionadas ao seu uso na prática clínica, quais sejam: ação rápida e previsível; maior janela terapêutica; menor necessidade de um controle laboratorial rígido; e pouca interação com drogas e alimentos. Além disso, como numerosas pesquisas de fase II e III demonstraram, ser utilizado em idosos e, mesmo, em portadores de insuficiência renal dependendo do grau da disfunção (havendo necessidade de maior cautela, neste último caso, sem inviabilizar o seu uso) (STAMPFUSS, 2013; EINSTEIN INVESTIGATORS, 2010; RECORD 1 INVESTIGATORS, 2008; RECORD2 INVESTIGATORS, 2008).

A grande heterogeneidade de resposta observada aquando do uso da Warfarina é explicada pela sua interação com diversos grupos de drogas, que inibem ou potencializam seu efeito, pela influência da dieta – tanto no que diz respeito ao teor de vitamina K, quanto às variações diárias desse teor – e, sobretudo a partir do ano 2000, quando foi sequenciado o DNA humano, pela presença de polimorfismos dos genes relacionados à metabolização da droga no organismo, o gene do CYP2C9 e o gene VKORC1, entre outros menos importantes (CARLQUIST, 2011; ANSELL, 2008; LURIE, 2010).

Uma vez estabelecida a importância dos polimorfismos encontrados nas diferenças de resposta à Warfarina, entre os indivíduos, muitos autores propuseram a implementação de algoritmos farmacogenéticos, visando a melhor estimar as dosagens necessárias em diferentes populações (FINKELMAN, 2011; VOORA, 2012). Considerando a possibilidade de amenizar a influência de fatores externos na ação da Warfarina, com medidas como o controle dietético e o cuidado na prescrição de fármacos com potencial de interação – menos difíceis no âmbito da prática clínica -, o conhecimento acerca do impacto dos diferentes genótipos das enzimas hepáticas ligadas ao seu metabolismo passou a ter maior importância, na visão destes pesquisadores. alguns estudos, poucos é verdade, chegaram a lançar luz até sobre o impacto da vitamina K exógena sobre o gene VKORC1, sugerindo, preliminarmente, haver maior regeneração da vitamina K hidroquinona em portadores do genótipo GG expostos à suplementação, quando comparado aos outros tipos (SCONCE, 2008).

As evidências científicas levaram a FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-FDA, do governo dos EUA, em 2007, a recomendar a incorporação de tabelas farmacogenéticas no bulário do medicamento Warfarina, explicitando as variações nos genótipos de VKORC1 e do CYP2C9, e seus cruzamentos, com relação aos alelos G e a, e aos alelos \*1, \*2 e \*3, respectivamente. Está demonstrada uma dependência de doses maiores ou menores da droga para alcançar o efeito anticoagulante de acordo com o genótipo do indivíduo, em relação ao tempo de metabolização da mesma no organismo e, conseqüentemente, maior ou menor risco de eventos hemorrágicos (FINKELMAN, 2011).

Enquanto no metabolismo da Warfarina, os genes supracitados atuam diretamente catalisando a reação de epóxi-redução da vitamina K, fundamental para tornar funcionais os fatores de coagulação K-dependentes, no caso da molécula do Rivaroxaban a metabolização ocorre pela via do CYP3A4 e do CYP2J2, além de mecanismos independentes do CYP. E o mecanismo que contribuiria para a toxicidade da mesma estaria relacionado à afinidade das moléculas do CYP P450 3A4 e 2J2 por drogas que, utilizando-se da mesma via, permitiriam um aumento de sua concentração no plasma (curva AUC) (HIGASHI, 2002; SEVRIOUKOVA, 2012)

As variações genéticas do CYP 2C9, seus alelos mais implicados \*1, \*2 e \*3, e os polimorfismos 1639G>a e 1173C>T no gene VKORC1 podem levar a variações na dose individual da Warfarina (THIJSSSEN, 2000; HIGASHI, 2002; RETTIE, 2006). Dados publicados em anos passados mostram uma redução média na dose necessária da droga de 30%, no caso da variante CYP2C9\*3, e igual porcentagem nas variantes mencionadas do VKORC1 (RETTIE, 2006), ratificando a importância que o conhecimento desses polimorfismos trouxe para o manejo mais seguro desta droga. Embora, como já mencionamos, o mecanismo de metabolização da molécula Rivaroxaban seja distinto, e a potencial interferência em sua ação esteja ligada ao antagonismo de competição, com moléculas de outras drogas por quem o seu CYP também apresente afinidade, a ausência de dados sobre a farmacogenética deste novo anticoagulante, aliada a evidências já existentes acerca de polimorfismos do



CYP3A4, relacionados com variações individuais no clearance de drogas (OKUBO, 2013) e risco aumentado para determinadas patologias, como a Leucemia e o Câncer de Próstata (FELIX, 1998; LOUKOLA, 2004), permite uma inferência acerca do potencial que polimorfismos nos genes do citocromo envolvido possam ter na ação deste fármaco.

Os dados atualmente disponíveis acerca da farmacocinética e da farmacodinâmica do Rivaroxaban definem a importância de se conhecer o potencial de interação entre esta droga e outros substratos que se utilizem das mesmas vias do CYP. Os resultados dos estudos atuais sugerem apenas haver relevância clínica quando ocorre a utilização concomitante com agentes fortemente inibidores do CYP (BAYER PHARMA, 2012; MUECK, 2013), mas é relevante o fato de que não existem dados publicados, até o momento, sobre a farmacogenética dos novos agentes, o Dabigatran (inibidor de Trombina) e o Rivaroxaban (inibidor oral direto do Fator Xa), e que genes que possam exercer influência na resposta a estes agentes devem estar relacionados à síntese de proteínas do seu metabolismo, do seu transporte, ou a proteínas-alvo; sendo que os polimorfismos no receptor alvo da droga podem ser fontes potenciais de variabilidade genética (CAVALLARI, 2013). Por analogia, ao que já ocorre com os polimorfismos dos genes da metabolização da Warfarina, polimorfismos implicados comprovadamente em alteração de resposta do novo fármaco poderiam, eventualmente, funcionar como marcadores de eficácia e segurança dos novos anticoagulantes orais.

A base genética para a resposta às drogas é encontrada tanto nas respostas similares observadas em membros de uma mesma família, quanto nos resultados significativamente diferentes observados em grupos étnicos diferentes. As fontes de variação farmacogenética podem ser de natureza farmacocinética, farmacodinâmica ou estar relacionadas a mecanismos da doença de base. As variações atualmente conhecidas com o uso dos anticoagulantes tradicionais são de natureza farmacocinética, ligadas a polimorfismos em enzimas metabolizadoras (genes do CYP2C9), que influenciam na concentração da droga, e farmacodinâmicas (VKORC1), que afetam a capacidade da droga de exercer a ação no seu alvo (VOORA, 2012). Alguns

polimorfismos do CYP3A4, ainda que não relacionados a situações de anticoagulação ou doença tromboembólica de qualquer natureza, apontaram indícios de que a diminuição na atividade ou expressão deste citocromo poderia ser a chave para a toxicidade de drogas ou interferência no seu metabolismo (THUMMEL, 1998; FELIX, 1998). Os estudos relacionados aos efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos do Rivaroxaban mostram que se trata de uma droga com efeitos previsíveis, e que sofre pouca influência de outras substâncias, à exceção dos considerados inibidores fortes do CYP3A4 que, por competição, levariam ao aumento de suas concentrações no plasma, um efeito farmacocinético (KUBITZA, 2013; MUECK, 2013).

Nossa premissa é que, analisando uma amostra de nossa população, fortemente miscigenada, possamos oferecer elementos para a farmacogenética dos novos anticoagulantes, no futuro.

Segundo Suarez-Kurtz (2014), o CYP3A5, um dos quatro genes da subfamília CYP3A, tem a sua expressão modulada por polimorfismo genético. É relevante, segundo este autor, a troca que ocorre em 6986 a>G, no intron 3, produzindo a mutação rs776746, e que leva à expressão de proteínas não-funcionais.

É mencionada a distribuição do alelo \*3 do CYP3A5, como um exemplo de diversidade populacional, em função da variação das frequências observadas entre populações de ancestralidade africana e europeias (SUAREZ-KURTZ, 2014). O afluxo de genes europeus em populações africanas, como em comunidades sul-africanas, por exemplo, impactou a distribuição deste gene, seu polimorfismo e sua expressão fenotípica (SUAREZ- KURTZ, 2014). Assim, três ideias subsidiaram nossa escolha em pesquisar o perfil molecular de genes da via de metabolização deste novo anticoagulante, além da já mencionada ausência de dados sobre a sua farmacogenética: 1) o reconhecimento da importância de identificar as diferenças na frequência dos alelos de genes polimórficos de interesse farmacogenético, entre as populações; 2) a presença de polimorfismo com repercussão funcional, já identificado em pelo menos um dos genes da subfamília CYP3A; 3) o fato de a população brasileira ser constituída pelas vias europeia, africana e ameríndia, e a peculiaridade da miscigenação na região norte do Brasil.



Na tabela 2, abaixo descrita, está demonstrado o perfil molecular dos genes CYP3A4 e CYP2J2 em 136 e 124 indivíduos saudáveis de nossa população, respectivamente. Observa-se que não foi encontrado nenhum indivíduo homozigoto mutante para o gene do CYP2J2, sendo rara a frequência do alelo T neste grupo, correspondendo a 4% (0,044) do total da amostra. Para este polimorfismo, foi predominante o alelo G, com uma frequência de 95% (0,955). Nos resultados para o polimorfismo rs2246709 no gene CYP3A4, nos 136 indivíduos pesquisados, houve predominância do genótipo heterozigoto, com frequência discretamente maior do alelo G (53%) em relação ao alelo mutante a (46%).

**Tabela 2. Perfil molecular dos genes CYP3A4 e CYP2J2 em nossa amostra**

<b>Gene</b>	<b>No. (%)</b>
<b>CYP2J2 (rs890293)</b>	<b>124</b>
TG	11 (8,9)
GG	113 (91,1)
TT	0
<i>Alelo T</i>	0,044
<i>Alelo G</i>	0,955
<b>CYP3A4(rs2246709)</b>	<b>136</b>
GG	20 (16,9)
AG	87 (73,7)
AA	11 (9,3)
<i>Alelo G</i>	0,538
<i>Alelo A</i>	0,461

A tabela 3 mostra a comparação entre a frequência genotípica do CYP3A4 na amostra investigada e em populações ancestrais. Em nossos resultados podemos observar uma menor frequência de indivíduos homozigotos para o alelo mutante a (cerca de 9%), em relação à distribuição observada nas demais populações, de maior equivalência entre si. Setenta e três por cento da amostra estudada correspondeu à forma heterozigota, discrepando do achado nas demais populações comparadas, em que esta distribuição foi mais equivalente entre si, correspondendo a 49%, a 41% e a 44%, respectivamente, em europeus, em africanos e em asiáticos. O genótipo homozigoto encontrado para o alelo G,

observado em 16% de nossa amostra, aproximou-se mais das frequências encontradas em populações africanas e asiáticas, enquanto apenas 7% desta variante foi achada no grupo ancestral europeu. a discrepância observada na frequência dos alelos a e G nos três grandes grupos ancestrais não foi identificada em nossa amostra, onde o alelo a foi encontrado em 46% e o alelo G em cerca de 53% dos 136 indivíduos submetidos a esta análise. Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os genótipos observados no estudo comparado a todas as populações ancestrais para o polimorfismo 99365719 a>G ( $P < 0,05$ ). A população miscigenada do norte do Brasil, apresentou, portanto, diferença na distribuição das frequências genótípicas em relação aos grupos ancestrais, formadores de nossa população.

**Tabela 3. Comparação das frequências genótípicas do CYP3A4 99365719A > G (rs2246709) entre nossa amostra e das populações ancestrais.**

CYP3A4 (99365719A>G)	A/A	A/G	G/G	A	G	P value
EUROPEU	0,490	0,433	0,077	0,706	0,293	<0,0001
AFRICANO	0,412	0,449	0,637	0,637	0,362	0,0001
ASIÁTICO	0,442	0,453	0,669	0,669	0,331	0,0001
POPULAÇÃO NORTE DO BRASIL	0,093	0,737	0,461	0,461	0,538	

Sendo <sup>a</sup>, comparação entre a população do Norte do Brasil e as populações ancestrais

Fonte: Banco de dados do NCBI ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2246709](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/snp_ref.cgi?rs=2246709)), acesso: janeiro de 2014

A tabela 4 apresenta uma distribuição predominante da frequência do genótipo homocigoto para o alelo G em nossa amostra, correspondendo a cerca de 91% (0,911) de 124 indivíduos analisados; uma frequência de 8% na forma heterocigota G/T; e ausência do genótipo mutante TT. a frequência do homocigoto G em nossa amostra se assemelhou ao observado nos grupos ancestrais europeu, africano e asiático;

assim como a ausência do alelo mutante T é um achado que guarda semelhança com a pequena frequência desta forma também observada nos demais grupos ancestrais. Na distribuição dos alelos do CYP2J2, em nossa amostra, existe o predomínio do alelo G. Não foi possível encontrar diferenças significativas entre a distribuição genotípica do polimorfismo -76 G>T em relação à distribuição para as populações ancestrais ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 4. Comparação das frequências genotípicas do CYP2J2 -76 G > T (rs890293) entre nossa amostra e das populações ancestrais.**

CYP2J2 (-76 G>T)	T/T	G/T	G/G	T	G	P value a
(-76 G>T)	0,002	0,136	0,905	0,048	0,951	0,578
AFRICANO	0,014	0,210	0,774	0,120	0,880	0,092
ASIÁTICO	0,001	0,064	0,934	0,033	0,966	0,488
POPULAÇÃO NORTE DO BRASIL	0,00	0,089	0,911	0,044	0,955	

Sendo <sup>a</sup>, comparação entre a população do Norte do Brasil e as populações ancestrais.

Fonte: Banco de dados do NCBI ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2246709](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP/snp_ref.cgi?rs=2246709)), acesso: janeiro de 2014.

Portanto, nas tabelas 2 e 3, em que se comparou a distribuição de frequências genotípicas para os polimorfismos estudados em nossa amostra, com o mesmo parâmetro em populações ancestrais - considerados os três principais troncos de nossa própria população -, os valores apresentados de distribuição de frequência dos diferentes genótipos ancestrais foram obtidos como uma média dos valores verificados nas principais séries publicadas no Banco de dados do NCBI pharmGKB, em que o número de indivíduos estudados foi de, pelo menos, cem (100) indivíduos analisados. Deve-se destacar que os bancos que forneceram as estimativas de frequência não investigaram número superior a 200 indivíduos.

Na tabela 5, são ilustradas as estimativas de ancestralidade subestruturadas de acordo com indivíduos portadores e não portadores de alelos mutantes (isoforma associada com redução na atividade enzimática) nos genes CYP2J2 e CYP3A4.

Os resultados evidenciados nesta tabela indicam que o polimorfismo

investigado no gene CYP2J2 não sofre influência da etnia. A análise para o polimorfismo 99365719a>G no gene CYP3A4 demonstra que existe uma correlação significativa entre as estimativas de ancestralidades e a presença de alelos mutantes ( $P < 0,05$ ). Desta forma podemos destacar que o polimorfismo investigado no gene CYP3A4 sofre influência da contribuição étnica individual.

**Tabela 5. Comparação do perfil de ancestralidade da amostra estudada**

	CYP2J2 (rs:890293)			CYP3A4 (rs: 2246709)		
	Presença <sup>a</sup>	Ausência <sup>b</sup>	P value	Presença <sup>c</sup>	Ausência <sup>d</sup>	P value
<b>Europeu</b>	0,72 ( $\pm 0,19$ )	0,73 ( $\pm 0,22$ )	0,595	0,82 ( $\pm 0,17$ )	0,71 ( $\pm 0,22$ )	<b>0,021</b>
<b>Africano</b>	0,06 ( $\pm 0,083$ )	0,08 ( $\pm 0,10$ )	0,588	0,44 ( $\pm 0,08$ )	0,08 ( $\pm 0,10$ )	<b>0,030</b>
<b>Ameríndio</b>	0,23 ( $\pm 0,21$ )	0,19 ( $\pm 0,18$ )	0,588	0,14 ( $\pm 0,17$ )	0,21 ( $\pm 0,18$ )	<b>0,032</b>

**Sendo:**

**a** - presença do alelo mutante T

**b** - ausência do alelo mutante T

**c** - presença do alelo mutante A

**d** - ausência alelo mutante A

**p** - value: Mann-Whitney U

As figuras 07, 08 e 09 ilustram em detalhes os resultados da tabela 5 para cada ancestralidade e a presença e ausência do alelo polimórfico no gene CYP3A4.

Na figura 07, temos um gráfico Box Plot que mostra a correlação significativa ( $P = 0,021$ ) entre aumento da ancestralidade europeia e a presença de alelos polimórfico no gene CYP3A4. Este aumento fica claro quando observamos um aumento de cerca de 10% nas estimativas de ancestralidade europeia no grupo com alelo polimórfico em relação ao grupo sem essa variante. Os dados evidenciados na figura sofreram forte influencia de algumas amostras no grupo sem alelo variante que apresentam baixas ancestralidades de origem europeia.

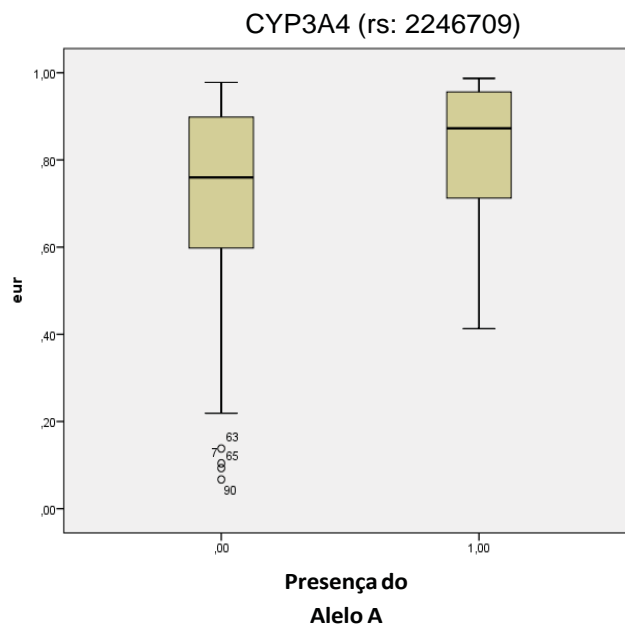


Figura 07. Distribuição de frequência do CyP3a4 (rs2246709) de acordo com a ancestralidade europeia.

Na figura 08, tem-se uma correlação significativa entre a ancestralidade nativa americana e a presença de alelos polimórficos no gene CYP3A4 ( $P = 0,032$ ). Podemos observar uma flutuação nas estimativas de ancestralidade ameríndias entre os grupos com alelos polimórficos no gene CYP3A4 (14%), quando comparado com o grupo sem essa variante (21%).

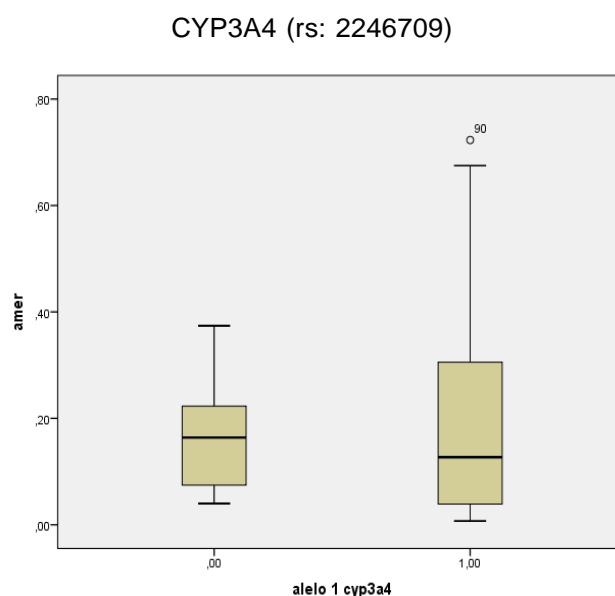


Figura 08. Distribuição de frequência do CyP3a4 (rs2246709) de acordo com a ancestralidade ameríndia.



a figura 09 evidencia uma correlação significativa entre a ancestralidade africana e a presença ou ausência de alelo polimórfico investigado no gene CYP3A4 ( $P= 0,03$ ). Podemos observar uma maior estimativa de ancestralidade africana com cerca do dobro (8% com e 4% sem o alelo polimórfico) no grupo sem o alelo polimórfico investigado no presente estudo. De maneira geral, as figuras demonstram um aumento significativo da ancestralidade europeia para os indivíduos portadores de alelo polimórfico (99365719a>G) no gene CYP3A4 em relação ao grupo de indivíduos sem este alelo e, inversamente, observa-se uma redução nas outras ancestralidades para o grupo portador de alelo mutante.

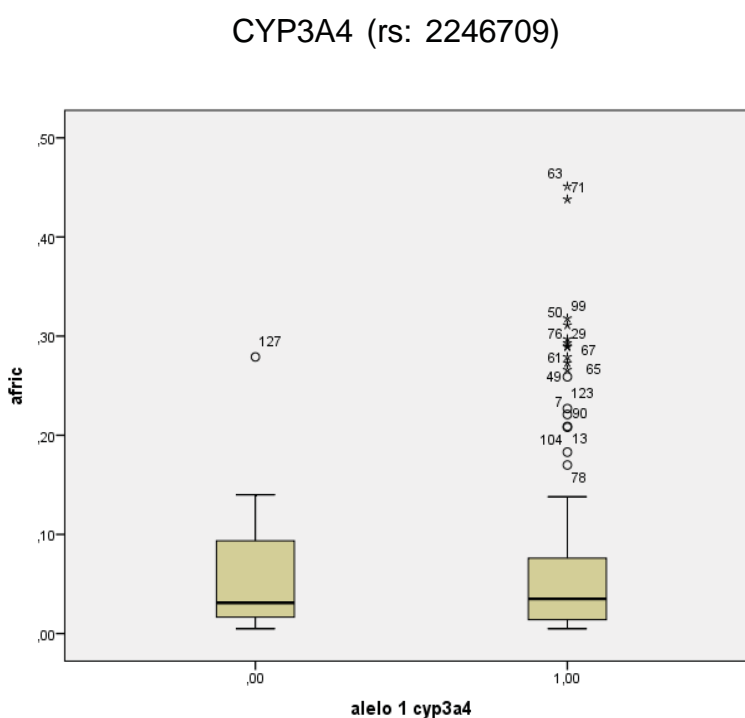


Figura 09. Distribuição de frequência do CyP3a4 (rs2246709) de acordo com a ancestralidade africana.

A terapia personalizada, conceito que emana da Farmacogenética, deve estar baseada na identificação de características genéticas individuais, ao invés das diferenças interétnicas em grupos na frequência dos polimorfismos que afetam a farmacocinética das drogas, e esse conceito é particularmente importante em populações miscigenadas (SUAREZ-KURTZ, 2005)

Um dos mais importantes impactos da variação do genoma humano está na resposta individual às drogas. A abordagem clássica que divide a humanidade em populações diferentes com base em raça, geografia, cultura, aspecto físico ou

qualquer outro critério, não parece ser a mais adequada para lidar com a variabilidade humana, porque desconsidera a dispersão dos tipos genéticos, e a posterior mutação, seleção e direcionamento genético (SUAREZ-KURTZ, 2006). Admite-se que a diversidade genética observada na Europa, Ásia, Oceania e nas américas seja equivalente à divisão em subconjuntos das variações encontradas na África (YU, 2002). Trabalho realizado em populações brasileiras, trouxe contribuição ao demonstrar a inadequação de se diferenciar os grupos com base em critérios como cor/raça, apresentando dados como a identificação de ancestralidade predominantemente europeia e africana (43,1%) em brasileiros auto-declarados pardos, enquanto a mesma ancestralidade foi identificada em 47,8% dos auto-declarados brancos, dentre outras interessantes informações extraídas de sua leitura (SUAREZ-KURTZ, 2014). Em estimativas anteriores para avaliar a ancestralidade europeia e africana em brasileiros, foi observado que mais de 75% dos auto-declarados brancos das regiões norte, nordeste e sudeste do país, apresentaram ancestralidade europeia abaixo de 90%, enquanto apenas cerca de 73% dos considerados negros mostraram uma ancestralidade predominantemente africana (SUAREZ-KURTZ, 2006).

a variação na frequência dos polimorfismos do CYP2C9 em populações miscigenadas de origem africana, em que se nota, no caso dos polimorfismos relacionados ao metabolismo da Warfarina, uma maior frequência dos alelos \*2 e \*3, reflete a ancestralidade europeia nessas populações, já que tais alelos são raramente observados em populações africanas nativas. a ocorrência desses polimorfismos aumenta progressivamente desde brasileiros com mais de 80% de ancestralidade africana. a baixa frequência desses polimorfismos (CYP2C9 \*2 e \*3) afeta a performance dos algoritmos de dosagem da Warfarina, assumindo-se o inverso como verdadeiro (SUAREZ-KURTZ, 2012).

O polimorfi associado ao gene da subunidade 1 da Vitamina K Epóxi do Redutase (VKORC1) é um bem documentado exemplo da diversidade farmacogenômica mundial. O Consórcio Internacional da Farmacogenômica da Warfarina (2011) agrupou pacientes

dos quatro continentes em três grupos de populações ancestrais, dividindo-os em asiáticos, afroamericanos e europeus e mostrou que o grupo portador de alelo mutado no rs9923231 tem reduzida expressão desta enzima hepática, e está associado com a necessidade de menores doses de Warfarina, para o RNI estar em margem terapêutica, havendo uma variação interindividual de resposta à droga por esse polimorfismo maior em indivíduos de origem europeia, possivelmente devido à menor ocorrência desta variante rs9923231 no grupo dos afrodescendentes. De acordo com Suarez-Kurtz (2012), nos brasileiros a frequência de distribuição do rs9923231 é uma função da ancestralidade africana, independente da “cor” relatada ou raça. Há outros polimorfismos de nucleotídeos simples ligados ao gene da VKORC1, relacionados ao metabolismo da Warfarina. Perini et al. (2008) encontraram resposta efetiva a menores doses de Warfarina em população miscigenada brasileira e alguns grupos de afroamericanos, relacionada ao alelo rs8050894 e rs2884737. Outros polimorfismos relacionados ao metabolismo da vitamina K investigados são: EPHX1, APOE,  $\gamma$ -Glutamil Carboxilase, CYP4F2, dentre outros (SUAREZ-KURTZ, 2012; HUTZ, 2011).

A compreensão do papel que tais alterações genéticas desempenham no metabolismo da Warfarina, levou à criação de diferentes algoritmos, nos quais a identificação desses polimorfismos nas diferentes populações, associados a outras variáveis já mencionadas anteriormente, pudesse contribuir para uma prescrição mais racional desta droga. Levando em conta as “reais” necessidades do indivíduo ou de grupos de indivíduos. Tais algoritmos têm por objetivo expressar um Coeficiente de Correlação entre a dose prevista e a dose prescrita do medicamento, naturalmente, visando a aproximar esta daquela. Parece bem definido, contudo, que os resultados da aplicação destes algoritmos de dosagem da Warfarina foram superiores em populações europeias, quando comparados aos das populações asiáticas e afroamericanas, o que é concernente com alguns argumentos acima expostos, além de dados explicitados fartamente em publicações sobre o tema, como as variações associadas a fatores não genéticos que modulam a resposta da droga (interação medicamentosa e dieta, por ex.), além de aspectos culturais, geográficos e contexto social.

Para Voora e Ginsburg (2012), enquanto alguns estudos sugeriram vantagens em relação ao modo padrão de prescrição, outros falharam em apontar benefícios, a não ser para pequenas alterações na dosagem da droga. Segundo estes autores, estudos multicêntricos em andamento permitirão melhor avaliar o benefício da incorporação farmacogenética à terapia com anticoagulantes orais.

Finkelman et al. (2011) apontaram que, mesmo com os algoritmos farmacogenéticos disponíveis, mostrando superioridade no ajuste da dose quando comparados com os outros métodos de ajuste disponíveis (método empírico, algoritmo puramente clínico, tabelas de genótipos, etc), em análise retrospectiva de 1378 pacientes em terapia com Warfarina, cerca de 48% destes pacientes persistiram inadequadamente avaliados para este fim.

Parece-lhes claro, em conclusão, que apesar de toda a pesquisa desenvolvida e recursos despendidos, uma significativa percentagem das variabilidades existentes permanece inexplicada. a discussão acerca da potencial melhora na capacidade de predição de dose desses algoritmos parece evidenciar que um tópico importante é incorporar a informação genética de estudos feitos em populações de afroamericanos. Outra corrente de pensamento em Farmacogenômica tem advogado haver benefícios na utilização de modelos de prescrição de drogas baseados em populações, ou a utilização das drogas com base em características étnicas e de ancestralidade das populações (SUAREZ-KURTZ, 2005). O conhecimento acumulado acerca da mistura genética advinda da miscigenação das populações, não permite mais haver dúvida de que europeus são geneticamente relacionados a africanos, tendo evoluído como um desdobramento deste último (SUAREZ-KURTZ, 2006). a população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de séculos de cruzamentos entre pessoas provenientes de três continentes: europeus, africanos e ameríndios. Assim sendo, nossa população seria a resultante da mistura dos três maiores componentes histórico- geográficos da humanidade (SUAREZ-KURTZ, 2006), daí advindo a importância de incorporar, futuramente, conhecimento farmacogenômico ao seu manejo clínico.

Estudos de epidemiologia molecular são bastante promissores na medida em que avaliam, em populações, as frequências de polimorfismos específicos relacionados à predisposição a uma determinada característica clínica (SUAREZ-KURTZ, 2006 SUAREZ-KURTZ, 2012; SUAREZ-KURTZ, 2014).

Esta pesquisa investigou dois importantes polimorfismos nos genes CYP2J2 e CYP3A4, que estão envolvidos na via de metabolização do Rivaroxaban.

Devido ao pouco conhecimento a respeito da farmacogenética do Rivaroxaban esta pesquisa se propôs a avaliar a influencia dos dois principais polimorfismos genéticos envolvidos no metabolismo do Rivaroxaban e sua influência para a ancestralidade genômica em uma população com elevado grau de mistura interétnica. A perspectiva é estabelecer base para futuras investigações casos-controles farmacogenéticas em nossa população.

Nossos resultados evidenciaram uma baixa frequência do polimorfismo -76 G>T do CYP2J2 na população do norte do Brasil, que não sofre influência da etnia. O polimorfismo do CYP3A4 (presença do alelo a), de maior prevalência na amostra analisada, apresentou correlação elevada com a ancestralidade europeia e baixa com a africana e asiática.

## 6 CONCLUSÕES

a) O Rivaroxaban é um inibidor oral direto do Fator Xa ativado, que apresenta efeitos farmacodinâmicos e farmacocinéticos previsíveis com poucas interações relevantes aquando do seu uso concomitante com drogas habituais, oferecendo resposta a várias das dificuldades relacionadas ao uso clínico dos anticoagulantes convencionais;

b) Não há dados publicados até o momento acerca da presença e distribuição do polimorfismo no CYP3A4 e no CYP2J2, relacionados ao metabolismo da nova droga e possíveis fontes de variabilidade genética;

c) Foi observada elevada prevalência de indivíduos com presença do Alelo A para o CYP3A4 em nossa população e a presença desse polimorfismo tem correlação direta com a ancestralidade europeia e redução nas estimativas de ancestralidade africana e asiática;

d) A perspectiva desta pesquisa é estabelecer bases para futuras investigações casos-controles farmacogenéticas em nossa população.

## 7 REFERÊNCIAS

ANSELL, J. et al. American College of Chest Physicians. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: evidence based clinical practice guidelines. 8<sup>th</sup> ed. Chest, n. 133, p. 160-198, 2008

APOSTOLAKIS, S. et al. The quest for new anticoagulants: from clinical development to clinical practice. Cardiovasc Ther, v. 29 (6), P. 12 – 22, 2011

BayER PHARMA. Xarelto® (Rivaroxaban). Summary of product characteristics, 2013

BULLER, H.R. et al. Subcutaneous fondaparinux versus intravenous unfractionated heparin in the initial treatment of pulmonary embolism. N Engl J Med, n. 349, p. 1695-1702, 2003

CARLQUIST, J.F.; ANDERSON, J.L. Using pharmacogenetics in real time to guide warfarin initiation. Circulation, n. 124, p. 2554-2559, 2011

CAVALLARI L.H., et al. Role of pharmacogenomics in the management of traditional and novel anticoagulants. Pharmacotherapy, v. 31, n. 12, p. 10, 2011

CHUDZINSKI, S. Bases do desenvolvimento de novos anticoagulantes. In: MAFFEI, F.H. et al. Doenças vasculares periféricas, Rio de Janeiro, Guanabara - Koogan, 4<sup>a</sup> ed, v. 1, p. 678 – 86, 2008

DAVIDSON, et al. Risk of bleeding in patients with acute venous thromboembolism treated with rivaroxaban or VKa and concomitant aspirin therapy or NSAIDs: subanalysis from EINSTEIN DVT and PE studies. J Thromb Haemost, v. 11 S2, abstract, 2013

ERIKSSON, B.I. et al. Dose-escalation study of rivaroxaban (Bay 59-7939) – an oral, direct Factor Xa inhibitor – for the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing total hip replacement. Thromb Res, v. 120, n. 5, p. 685-93, 2007

ERIKSSON, B.I. et al. Pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of Rivaroxaban: a comparison of once and twice daily doses on patients undergoing total hip replacement (THR). J Thromb Haemost, v.5(1), abstract PM659, 2010

ERIKSSON, B.I. et al. RECORD1 Study group. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. N Engl J Med, v. 358, n. 26, p. 2765-75, 2008

- FINKELMAN, BS; GaGE, BF; jOHNSON, ja; BRENSINGER, CM; KIMMEL, SE. Genetic warfarin dosing. Tables versus algorithms. *jaCC*, v. 57, n. 5, p. 612-618, 2011
- GARCIA, D. Novel anticoagulants and the future of anticoagulation. *Thromb Res*, v. 123 (4), p. 50 -55, 2009
- GUENGERICH, F.P. Cytovrome P- 450 3a4: regulation and role in drug metabolism. *annu. Rev. Pharmaol Toxicol*, v. 39, p. 1 – 17, 1999
- GUIMARÃES, j; ZaGO, aj. anticoagulação oral. *Rev. HCPa*, v. 27, n. 1, 2007
- GUSTAFSSON, D. Oral direct thrombin inhibitors in clinical development. *j Intern Med*, v. 254, n. 4, p. 322-24, 2003
- HERBERT, jM; HERAULT, jP; BERNAT, a et al. Biochemical and pharmacological properties of SaNORG 340006, a potent and long-acting synthetic pentasaccharide. *Blood*, v. 91, n. 4, p. 197-205, 1998
- HyLEK, EM; SINGER, DE. Risk factors for intracranial hemorrhage in outpatients taking Warfarin. *ann Intern Med*, n. 120, p. 897-902, 1994
- IEKO, M. et al. Synthetic selective inhibitors of coagulation factor Xa strongly inhibit thrombin generation without affecting initial thrombin forming time necessary for the platelet activation in hemostasis. *j Thromb Haemost*, v. 2 (4), p. 612 – 18, 2004
- IRINA, F. SEVRIOUKOVA, a; POULOS, Thomas L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3a4: recent advances and remaining problems. *Dalton Trans*, v. 42, p. 3116, 2013
- jOHNSON, ja. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CyP2C9 and VKORC1 Genotypes and Warfarin Dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 90, n. 4, p. 625-629, 2011
- KAKKAR, AK. et al. RECORD2 Investigators. Extended duration of rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomized controlled trial. *Lancet*, v. 372, n. 9632, p. 31-39, 2008
- KOERTKE, H. et al. Low-dose International Normalized Ratio self-management: a promising tool to achieve low complicated rates after mechanical valve replacement. *ann Thorac Surg*, n. 79, p. 1909-1914, 2005



- KOLLER, F. History of factor X. *ThrombDiathHaemorrh*, v. 4, p. 58 – 65, 1960
- KREUTZ, R. Pharmacodynamic and pharmacokinetics basis of Rivaroxaban. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 26, n. 2012, p. 27-32, 2012
- KUBITZA, D. et al. Absence of clinically relevant interactions between rivaroxaban – na oral, direct Factor Xa inhibitor – and digoxin or atorvastatin in healthy subjects. *j Int Med Res.*, v. 40, n. 5, p. 1688-707, 2012.
- KUBITZa, D. et al. Safety, pharmacodynamics and pharmacokinectis of single doses os Bay 59-7939, na oral, direct factor Xa inhibitor. *ClinPharmacolTher*, v. 78, n. 4, p. 412-21, 2005
- KUBITZa, D; PERZBORN, E; BERKOWITZ, SD. The Discovery of Rivaroxaban: translating preclinical assessments into clinical practice. *Front Pharmacol*, v.4, n.145, 2013
- LaSSEN, MR. et al. RECORD3 Investigators (174 col). Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboproophylaxis after total knee arthroplasty. *N Engl j Med*, v. 358, n. 26, p. 2776-86, 2008
- LEE, Ca. et al. Identification of novel substrates for humam cytochrome P450 2j2. *Drug MetabDispos*, v. 38, n. 2, p. 347 – 56, 2010
- LEE, SS; et al. Identification and functional characterization of novel CyP2j2 variants: G 312R variants causes loss of enzyme catalytic activity. *Pharmacogenet Genomics*, v. 15, n. 2, p. 105-13, 2005
- LEHMANN, JM. et al. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by com- pounds that regulate CyP3a4 gene expression and cause drug interactions. *j Clin Invest*, v. 102, n. 5, p. 1016–1023, 1998.
- LIMA, aF. et al. Hipersensibilidade à Varfarina - que abordagem? *acta Med Port*, v.23(4), p.727-30, 2010.
- LOUKOLA, A. et al. Comprehensive evaluation of the association between prostate cancer and genotypes/haplotypes in CyP17a1, CyP3a4, and SRD5a2. *Eur j Hum Genet*, v. 12, n. 4, p. 321-320, 2004
- LURIE, y. et al. Warfarin and vitamin K intake in the era of pharmacogenetics. *Br j ClinPharmacol*, v. 70, n. 2, p. 164-170, 2010.

MUECK, W. et al. Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: pharmacokinetics effects in healthy subjects. *Br j Clin Pharmacol*, v. 76, n. 3, p. 455-466, 2013

NERBERT, DW; RUSSELL, DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, v. 360 (9340), p. 1155 – 62, 2002

OKUBO, M. et al. CyP 3a4 intron 6 C>T polymorphism (CyP 3a4\*22) is associated with reduced CyP3a4 protein level and function in human liver microsomes. *j Toxicol Sci*, v. 38, n. 3, p. 349-354, 2013

PERZBORN, E. et al. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent Bay59 – 7939 – an oral, direct Factor Xa inhibitor. *j Thromb Haemost*, v. 3, n. 3, p. 514-521, 2005

RACHED, RA; OLIVEIRA, MCM; RACHED, RDVA. Antagonistas da vitamina K. In: MaFFEI, FHa. Et al. *Doenças Vasculares Periféricas*, Rio de Janeiro, 4 ed, v. 1, p. 668-677, 2008

SCONCE, EA. Et al. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) polymorphism influences the anticoagulation response subsequent to vitamin K intake: a pilot study. *j Thromb Haem*, v.6, p. 1226-1228, 2008

SPIECKER, M. et al. Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of cytochrome P450 epoxigenase CyP2j2. *Circulation*, v. 110, n. 15, p. 2132-2136, 2004

STAMPFUSS, j. et al. The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. *Int j Clin Pharmacol Ther*, v. 51, n. 7, p. 549-61, 2013

STAMPFUSS, j; KUBITZa, D; BECKa, M; MUECK, W. The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. *Int j Clin Pharmacol Ther.*, v. 51, n.7, p. 549-561, 2013.

SUAREZ-KURTZ, G. et al. Global Pharmacogenomics distribution of CyP3a5 polymorphism and phenotypes in the Brazilian population. *Plos ONE* 9 (1): e 83472. doi:10.1371/journal.pone.0083472, 2014.

SUAREZ-KURTZ, G; BOTTON, MR. Pharmacogenomics of Warfarin in population of African descent. *B j Clin Pharmacol*, v. 75 (2), p. 334 – 46, 2012.

SUAREZ-KURTZ, G; PENa, SDj. Pharmacogenomics in the Americas: The Impact of Genetic admixture. *Current Drug Targets*, v. 7, p. 1649 – 1658, 2006.

SUAREZ-KURTZ, G. Pharmacogenomics in ad mixed population. TRENDS in Phar- macological sciencis, v. 26, n. 4, 2005.

THE COLUMBUS INVESTIGaTORS: Low-molecular-weight Heparin in the treatment os patients with venous thromboembolism. N Engl j Med, vol. 337 (10), p. 657 – 62, 1997

THE EINSTEIN Investigators. Oral Rivaroxaban for symptomatic venous thromboem- bolism. N Engl j Med, v. 363, p. 2499-2510, 2010

TIRONA, RG. et al .The orphan nuclear receptor HNF4 alpha determines PXR- and CaR-mediated xenobiotic induction of CyP3a4. Nat Med, v. 9, n. 2, p. 220-4, 2003

TURPIE aG, et al. RECORD4 Investigators (171 col). Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty(RECORD4): a randomised Trial. Lancet, v. 373, n. 9676, p. 1673-1680, 2009

TURPIE, aG. et al. Fondaparinux VS enoxaparin for the prevention of venous throm- boembolism in major orthopedic surgery: a metanalysis of 4 randomized double-blind studies. arch Intern Med, v. 162, n. 16, p. 833-840, 2002

VOORa, D; GINSBURG, GS. Clinical application of Cardiovascular Pharmacogenet- ics. jaCC, v. 60, n. 1, p. 9-20, 2012

WEINZ, C. et al. Pharmacokinetics of Bay 59-7939 – na oral, direct Factor Xa inhibi- tor – in rats and dogs. Xenobiotica, v. 35, n. 9, p. 891-910, 2005

WEITZ, jI; BaTES, SM. New anticoagulants. j ThrombHaemost, v. 3, n. 1, p. 843 -853, 2005

WORLD Health Organization Expert Committee on Biological Standardization 33<sup>rd</sup>: Technical report series n. 687. Geneve, Switzerland: World Health Organization, 1983

WU, S. et al. Molecular cloning and expression of CyP2j2, a humam cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. j Biol chem, v. 27, n. 7, p. 3460– 3468, 1996

YOSHIDa, R; yOSHIDa, WB; ROLLO, H. Novos anticoagulantes para a profilaxia do tromboembolismo venoso em cirurgias ortopédicas de grande porte. j Vasc Bras, v. 10, n. 2, 2011